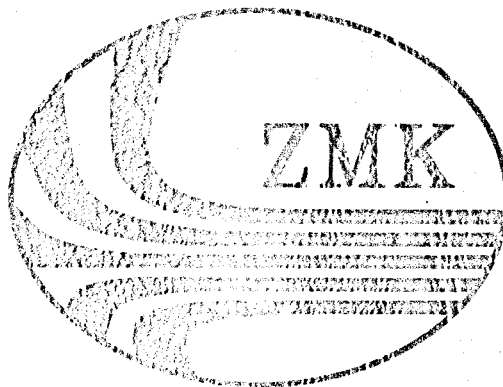


**BERICHTE AUS DEM  
ZENTRUM FÜR MEERES- UND KLIMAFORSCHUNG**

Reihe E: Hydrobiologie und Fischereiwissenschaft

---



Nr. 3

CATRIONA CLEMMENSEN-BOCKELMANN

Das RNA/DNA Verhältnis als Indikator  
für den Ernährungszustand von Fischlarven

**Berichte aus dem Zentrum für Meeres- und Klimaforschung  
Reihe E: Hydrobiologie und Fischereiwissenschaft**

**Nr. 3**

**CATRIONA CLEMMESSEN-BOCKELMANN**

**Das RNA/DNA Verhältnis als Indikator  
für den Ernährungszustand von Fischlarven**

**Institut für Hydrobiologie und Fischereiwissenschaft  
Hamburg 1992**

**Die "Berichte aus dem Zentrum für Meeres- und Klimaforschung"**  
erscheinen in 6 Reihen mit folgendem Inhalt:

<b>Reihe A:</b>	<b>Meteorologie</b>
<b>Reihe B:</b>	<b>Ozeanographie</b>
<b>Reihe C:</b>	<b>Geophysik</b>
<b>Reihe D:</b>	<b>Biogeochemie und Meereschemie</b>
<b>Reihe E:</b>	<b>Hydrobiologie und Fischereiwissenschaft</b>
<b>Reihe Z:</b>	<b>Interdisziplinäre Zentrumsberichte</b>

Alle Beiträge sind unredigiert und geben allein die Meinung des Verfassers wieder. Sie sollen in erster Linie dem sich mit dem jeweiligen Thema befassenden Personenkreis als Arbeitsunterlagen dienen und sind oft gleichzeitig Berichte für die Institutionen, die die betreffenden Arbeiten gefördert haben.

Exemplare dieser Arbeit können bezogen werden über:

**Institut für Hydrobiologie und Fischereiwissenschaft**  
**Olbersweg 24**  
**2000 Hamburg 50**

Diese Arbeit wurde am 10.04.1992 vom Fachbereich Biologie der Universität Hamburg als Dissertation angenommen.

- 1. Gutachter: Prof. Dr. W. Nellen**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. W. Willwock**

---

**ISSN 0936-949X**

**Zentrum für Meeres- und Klimaforschung der Universität Hamburg**  
**Bundesstr. 55 - 2000 Hamburg 13**

**AUS DEM ZENTRUM FÜR MEERES- UND KLIMAFORSCHUNG DER  
UNIVERSITÄT HAMBURG**

**Das RNA/DNA Verhältnis als Indikator  
für den Ernährungszustand von Fischlarven**

**DISSERTATION**  
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

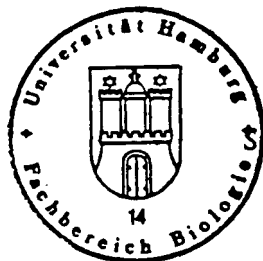
**Catriona Clemmesen-Bockelmann**  
aus Glasgow/ Schottland

Hamburg 1992

**INSTITUT FÜR HYDROBIOLOGIE UND FISCHEREIWISSENSCHAFT**

genehmigt vom  
Fachbereich Biologie  
der Universität Hamburg  
auf Antrag von Prof. Dr. W. Nellen

Hamburg, den 12.05.1992



Prof. Dr. L. Kies

Sprecher des Fachbereichs Biologie

## DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. W. Nellen für die Überlassung des Themas und das hohe Maß an Selbständigkeit und Vertrauen, das mir bei der Durchführung der Arbeit gewährt wurde, für die wertvollen Hinweise bei der Durchsicht des Manuskriptes und das Verständnis für meine familiäre Situation.

Bei Herrn Prof. Dr. D. Schnack bedanke ich mich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Institut für Meereskunde in Kiel und für das Interesse und die Unterstützung meiner Arbeit.

Meinem Kollegen Bernd Ueberschär danke ich für die gute Zusammenarbeit im Labor und auf See bei freundschaftlicher Arbeitsatmosphäre, für viele Anregungen und stete Diskussionsbereitschaft und für seine Unterstützung und sein Verständnis für meine familiäre Situation.

Ich danke Herrn Dr. Axel Jahns, Frau Dr. Trixi Both und Herrn Dr. Karsten Tiffert sowie den Mitarbeitern des biochemischen Instituts an der Universität Kiel für die Diskussionsbereitschaft und Hilfe, die mir bei der Entwicklung der biochemischen Methoden sehr nützlich waren.

Herrn Dr. Joachim Gröger danke ich für die "statistische Beratung".

Herrn Dirk Jarosch und Herrn Rudi Lütje möchte ich für die hervorragende technische Hilfeleistung beim Aufbau der Fischlarvenaufzuchtanlage und für die Assistenz auf den Seereisen danken.

Den Besatzungen der Forschungsschiffe Sagitta, Poseidon und Meteor sei für ihre Hilfsbereitschaft und das freundschaftliche Arbeitsklima an Bord gedankt.

Meinen Hamburger Kollegen Andreas Röpke und Andreas Sieg danke ich für ihre Diskussionsbereitschaft.

Den Mitarbeitern des Instituts für Meereskunde in Kiel gilt mein Dank für die Unterstützung bei dieser Arbeit und das Interesse, das sie ihr entgegenbrachten.

Meinem Mann Wilhelm gilt jedoch mein ganz besonderer Dank, da er trotz eigener Arbeit stets für die meinige Zeit und Verständnis aufbrachte, mir den nötigen moralischen Rückhalt bot und mir dadurch das Durchhalten erleichterte. Auch für seine viele Unterstützung bei der Einarbeitung in die Graphik- und Textverarbeitungsprogramme, die ständige Diskussionsbereitschaft und seine sehr hilfreiche und konstruktive Kritik bei der Durchsicht des Manuskriptes danke ich ihm recht herzlich.

Ich danke meinen Kindern Ayla (geb. am 14.04.88) und Daniel (geb. am 06.04.91), die zwar die Fertigstellung der Arbeit nicht gerade beschleunigten, mich aber immer wieder aufzumuntern wußten und mir damit die nötige Lebensfreude und Kraft gaben, um diese Arbeit fertigstellen zu können.

Eka Rudnick und Familie danke ich für die ausgezeichnete Betreuung meiner Kinder, die mir ermöglichte, an diesem Thema weiterarbeiten und die Arbeit fertigstellen zu können.

Für eine Finanzierung über einen Zeitraum von 15 Monaten zur Untersuchung der "Biochemie von Fischlarven" danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG Ne 99/19-1).

Diese Arbeit stellt den Abschlußbericht des BMFT-Projektes MFE 0941/9 dar, dem ich für die Förderung dieses Vorhabens danke.

All denen, die hier nicht genannt werden können, aber mit Rat und Tat zur Anfertigung dieser Arbeit beigetragen haben, sei mein Dank versichert.

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>6</b>
2.1	Analytik .....	6
2.1.1	Chemikalien.....	6
2.1.2	Nukleinsäurebestimmung aus Fischlarvenhomogenaten .....	6
2.1.2.1	Extraktion und Reinigung der Nukleinsäuren .....	6
2.1.2.2	Fluorimetrische Nukleinsäurebestimmung.....	7
2.1.2.3	Agarosegel Elektrophorese.....	11
2.2	Laboraufzucht der Fischlarven .....	11
2.2.1.	Befruchtung und Inkubation .....	11
2.2.2	Larvenhälterung .....	13
2.2.3	Abiotische Bedingungen in den Hälterungsanlagen .....	15
2.2.4	Fütterung der Fischlarven.....	16
2.2.5	Versuchsaufbau und Probennahme .....	19
2.3	Felduntersuchungen an Heringslarven .....	23
2.3.1	Fanggebiete und Fanggeräte.....	23
2.3.2	Auswertung der befischten Stationen.....	26
2.4	Statistische Auswertung .....	27
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>28</b>
3.1	Analytische Methoden .....	28
3.1.1	Überprüfung der Methodik zur Extraktion, Reinigung und fluorimetrischen Bestimmung von Nukleinsäuren .....	28
3.1.2	Optimierung der Methoden .....	32
3.1.3	Vergleich der eingesetzten fluorimetrischen Nukleinsäurenachweismethoden .....	35
3.1.4	Ausbeutebestimmung im Präparationsgang.....	36
3.2	RNA- und DNA- Gehaltsbestimmungen von Herings- und Steinbuttlarven aus Laboraufzuchten .....	37
3.2.1	Einfluß des Hungerintervalls auf das RNA/DNA Verhältnis .....	37
3.2.2	RNA/DNA Verhältnisse in Abhängigkeit vom Larvenalter.....	41
3.2.3	RNA/DNA Verhältnisse in Abhängigkeit von der Larvenlänge .....	46



3.3.	Einfluß von weiteren Faktoren auf die RNA/DNA Verhältnisse von Heringslarven aus der Laboraufzucht.....	53
3.3.1	Futterorganismen im Darm der Larven.....	53
3.3.2	Futterdichte.....	54
3.3.3	Reaktion des RNA/DNA Verhältnisses auf Futterzugabe.....	55
3.3.4	Temperatur .....	57
3.4	Vergleich der Ergebnisse der RNA/DNA Bestimmungen an Herings- und Steinbuttlarven.....	58
3.5	Bestimmung des Ernährungszustandes von Heringslarven aus Felduntersuchungen .....	62
3.5.1	Bestimmung des Anteils hungernder Heringslarven aus Feldproben anhand des "Hungerbandes" .....	63
3.5.2	Vergleich der Ernährungslage der Heringslarven aus den verschiedenen Untersuchungsgebieten.....	68
3.5.3	Beurteilung des Ernährungszustandes von Heringslarven anhand des "Futter"- und "Hungerbandes".....	74
3.6	Eignung der Laboraufzuchtanlage.....	77
4.	<b>Diskussion.....</b>	<b>79</b>
4.1.	Analytische Methoden .....	79
4.2.	RNA/DNA Verhältnisse von Fischlarven aus Laboraufzuchten .....	83
4.3	Anwendung der Laborergebnisse auf Larven aus in situ Fängen zur Beurteilung des Ernährungszustandes .....	94
4.4	RNA/DNA Verhältnisse von Larven aus in situ Untersuchungen.....	98
4.5	Vergleich der RNA/DNA Verhältnisse von Larven aus Labor- und Feldproben .....	103
4.6.	Schlußbetrachtung und Ausblick .....	104
5.	<b><u>Zusammenfassung</u>.....</b>	<b>108</b>
6.	<b>Literatur.....</b>	<b>111</b>
	<b>Verzeichnis der Abkürzungen.....</b>	<b>124</b>

## 1. EINLEITUNG

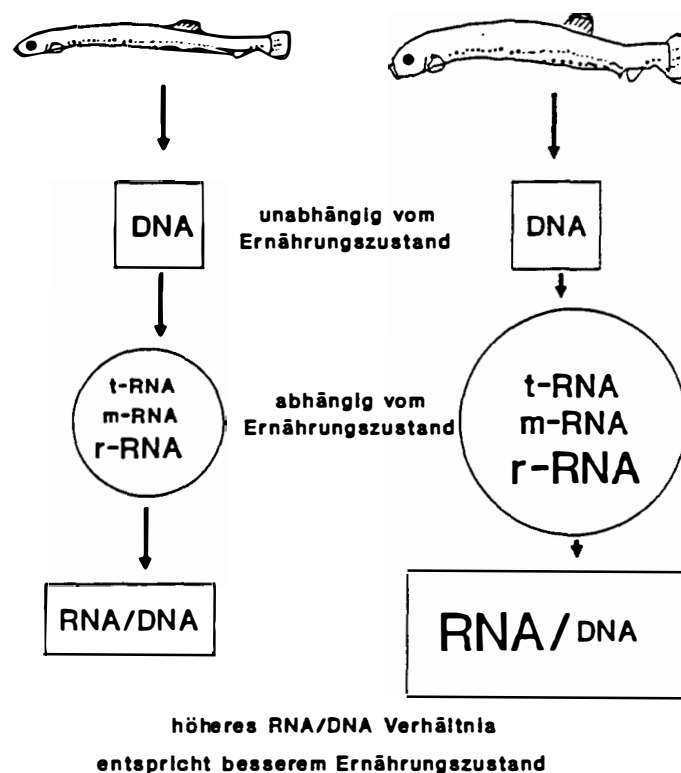
Charakteristisch für die meisten marinen Fische ist eine hohe Fruchtbarkeit und eine geringe Überlebensrate der frühen Lebensstadien. Die während der Larvalphase auftretende Mortalität scheint für die folgende Rekrutierung bestimmend zu sein und ist damit verantwortlich für die Schwankungen in den Jahrgangsstärken (HJORT 1914, HUNTER 1976, MAY 1974). Die genaue Kenntnis der Zusammenhänge, die die Rekrutierung bestimmen, stellt eine der großen Lücken in der fischereibiologischen Bestandskunde dar. Um Fluktuationen in den Fischbeständen voraussagen zu können, ist es wichtig, die Faktoren, die das Überleben von Fischlarven beeinflussen, zu verstehen (ROTHSCHILD 1982, 1986). Neben abiotischen Faktoren wie hydrographischen Verhältnissen (FORTIER & LEGGETT 1983, FRANK & LEGGETT 1982, ILES & SINCLAIR 1982, SINCLAIR et al. 1985) werden Wegfraß durch Räuber (BAILEY & HOUDE 1989, NELLEN 1986, SISENWINNE 1984) oder Verhungern der Larven ("Verhungerungs-Hypothese"; CUSHING 1975, HJORT 1914, 1926, LASKER 1975, THEILACKER & DORSEY 1980, WARE et al. 1981) als wichtigste Gründe für die hohe Larvenmortalität angenommen. Wahrscheinlich aber wirken diese Prozesse, Nahrungsmangel verbunden mit reduziertem Wachstum und Anfälligkeit gegenüber dem Druck durch Räuber sowie Verdriftung aus günstigen Aufwuchsgebieten, zusammen (FOLKVORD & HUNTER 1986, GADOMSKI & PETERSEN 1988, MILLER et al. 1988, RICE et al. 1987). Untersuchungen zum Verhungern von Fischlarven stellen einen der Schwerpunkte bei der Bearbeitung der Rekrutierungsproblematik dar und bilden die Grundlage für diese Arbeit.

Basierend auf HJORT's "Critical Period Concept", das davon ausgeht, daß massenhaftes Verhungern zum Zeitpunkt der Umstellung von interner Ernährung (Dottersack) auf externe Ernährung beim Fehlen von geeigneten Futterorganismen zu den beobachteten Variationen in der Rekrutierungsrate führt, entwickelte CUSHING (1975) die "Match-Mismatch" Theorie. Sie beruht darauf, daß die Produktion der Larven zeitlich günstig mit der Produktion der jeweiligen Futterorganismen zusammenfallen muß, um einen hohen Rekrutierungserfolg zu erzielen. Bei der Überprüfung der "Verhungerungs-Hypothese" haben Laboruntersuchungen gezeigt, daß irreversibles Verhungern bei Futterentzug schnell erreicht ist (BLAXTER & EHRLICH 1974, BLAXTER & HEMPEL 1963, LASKER et al. 1970, MCGURK 1984).

Methoden und Kriterien zur Beurteilung des Ernährungszustandes sind die Bestimmung von Längen- Gewichts- Beziehungen (BLAXTER 1971, SHELBOURNE 1957, WERNER & BLAXTER 1981) sowie von morphometrischen (EHRlich et al. 1976, FRANK & McRUER 1989) und chemischen Zustandsgrößen (EHRlich 1974 a,b). Damit können Unterschiede innerhalb einzelner Larvenkohorten aufgezeigt werden. Aufgrund von Problemen bei der Übertragbarkeit von Laborkalibrierungen auf Felduntersuchungen ist ihre Verwendung zur Charakterisierung des Ernährungszustandes von Fischlarven aus Felduntersuchungen sehr schwierig. Histologische Untersuchungsmethoden (O'CONNELL 1976, SIEG 1989, THEILACKER 1978, 1986, WATANABE 1985) dagegen sind als Kriterium geeignet. Sie erfordern aber umfangreiche Erfahrungen bei der Beurteilung histologisch- mikroskopischer Bilder. Mit biochemischen Methoden kann der Einfluß von Hungerzeiten bestimmt und objektiv gemessen werden. Da sie auf subzellulärer Ebene arbeiten, sind sie in der Lage, physiologische Änderungen zu quantifizieren. Die Übertragung von Laborergebnissen zur Bewertung von Felduntersuchungen ist daher weniger problematisch. Neben den Messungen der proteolytischen Verdauungsenzymaktivitäten (HJELMELAND et al. 1984, LAUFF & HOFER 1984, PEDERSEN 1987, UEBERSCHÄR 1985, 1987, 1988) und Lipidanalysen (FRASER 1989, HAKANSON 1989 a,b, MARTIN et al. 1984) eignet sich die Untersuchung von Nukleinsäuren zur Beurteilung der Ernährungslage, da Nukleinsäuren Schlüsselrollen in Wachstum und Entwicklung einnehmen.

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist der primäre Träger der genetischen Information, sie ist stabil gegenüber Umwelteinflüssen und kann als Maß für Biomasse (HOLM-HANSEN et al. 1968) und Zellzahl (REGNAULT & LUQUET 1974) genutzt werden. Daneben existieren drei Arten von Ribonukleinsäure (RNA), die in direkter Beziehung zur Proteinbiosynthese stehen. Die ribosomale RNA (r-RNA) gehört zu den Struktur- und Funktionselementen der Ribosomen. Die Transfer- RNA (t-RNA) transportiert Aminosäuren zum Proteinbiosyntheseapparat. Die Messenger-RNA (m-RNA) liefert während der Proteinbiosynthese ein Transkript des Gens. Den Hauptteil der zellulären RNA nimmt die r-RNA mit 85-94 % ein (MILLWARD et al. 1973, YOUNG 1970). Die Menge gebildeten Proteins ist von zwei generellen Mechanismen abhängig. Zum einen führt eine Erhöhung der Aktivität der Ribosomen, zum anderen eine Erhöhung der Anzahl der Ribosomen zu einer größeren gebildeten Proteinmenge (HENSHAW et al. 1971, LIED et al. 1982, LIED & ROSENLUND 1984, LOUGHNA & GOLDSPINK 1984). So fanden CLIFFORD et al. (1972) bei Untersuchungen an Rattenlebern, daß Ribosomen nach Futteraufnahme zu Polysomen, der Proteinbiosynthese- leistenden Einheit, aggregieren. Futterentzug führte zu einer Poly-

somenauflösung. Mit fortschreitender Hungerzeit kommt es zu einer Abnahme des Ribosomengehaltes und damit zu einem meßbar geringeren RNA- Gehalt bei gleich bleibendem DNA- Gehalt. Da die Anzahl der Ribosomen pro Zelle abnimmt, wirkt sich die Hungerzeit deutlich auf das RNA/DNA Verhältnis aus (LIED et al. 1982). Die Proteinbiosynthese und damit das Wachstum ist abhängig von der Menge gebildeter RNA. Das Verhältnis der RNA zu der jeweils vorhandenen konstanten Menge an DNA ergibt damit einen Index für die metabolische Intensität. Die Zusammenhänge werden in Abb. 1 veranschaulicht.



**Abb. 1:**

Auswirkung von zwei unterschiedlichen Ernährungszuständen auf die RNA- und DNA-Gehalte. Die linke Heringslarve symbolisiert einen schlechten, die rechte einen guten Ernährungszustand. Die Schriftgrößen machen die unterschiedlichen Nukleinsäurekonzentrationen deutlich.

BUCKLEY (1979, 1980, 1981) untersuchte als erster Nukleinsäuregehalte und deren Veränderungen bei hungernden und gefütterten Fischlarven. Die von BUCKLEY (1979) überarbeitete Nukleinsäure- Analysemethode geht auf SCHMIDT & THANN-HAUSER (1945) mit Modifikationen von MUNRO und FLECK (1966 b) zurück. Der von BUCKLEY verwendete analytische Aufschluß ermöglichte keine Unterscheidung der RNA- Arten und keine Aktivitätsbestimmung der Ribosomen. Um den Einfluß von Hungerzuständen, die für das Überleben von Fischlarven kritisch sein könnten, zu erfassen, ist es nicht erforderlich, kurzfristige Aktivitätsänderungen der Ribosomen zu messen, sondern den Einfluß von Hungern über einen längeren Zeitraum verfolgen zu können, d.h. es wird ein Index gesucht, der es ermöglicht, den längerfristigen Einfluß von Hunger erfassen zu können. Wie die oben genannten Studien zeigten, führen erst längere Hungerzeiten zu einem Abbau an r-RNA bei gleichbleibendem DNA- Gehalt. In mehreren Studien an Fischlarven konnte die Annahme, daß das RNA/DNA Verhältnis als Indikator für den Ernährungszustand geeignet ist, bestätigt werden (BUCKLEY 1980, 1981, 1984, BUCKLEY & LOUGH 1987, CLEMMESSEN 1987, FUKUDA et al. 1986, MARTIN et al. 1985, RAAE et al. 1988, ROBINSON & WARE 1988). Die in diesen Untersuchungen verwendete Methode ließ jedoch keine individuellen Messungen bei jungen Fischlarven zu. Je nach Größe waren 10-30 Larven für eine RNA/DNA Analyse erforderlich. Damit war eine Bestimmung der individuellen Kondition von Fischlarven nicht möglich. Eine empfindlichere Methodik zur Bestimmung von RNA und DNA aus Fischlarvengewebe mußte daher entwickelt werden, um neben der Bestimmung einer mittleren Kondition die individuelle Streuung erfassen und der "Verhungerungs- Hypothese" nachgehen zu können.

Ausgehend von Methoden zur RNA- und DNA- Bestimmung, die von LePECQ & PAOLETTI (1966), KARSTEN & WOLLENBERGER (1972, 1977) und BOER (1975) beschrieben und bei Ratten angewendet wurden, wurden fluoreszenz-photometrische Nachweistechiken für RNA und DNA entwickelt, deren Empfindlichkeit den Nukleinsäurenachweis aus individuellen Fischlarven ermöglichte.

Um Aussagen über den Ernährungszustand von Larven aus Feldproben machen zu können, mußten die Nukleinsäurenachweisverfahren durch Laborexperimente kalibriert werden. Dazu wurden Herings- und Steinbuttlarven unter kontrollierten Bedingungen in Versuchsaquarien bei unterschiedlich langen Fütterungs- bzw. Hungerintervallen aufgezogen und deren individuelle RNA/DNA Verhältnisse bestimmt. Basierend auf diesen Laboruntersuchungen sollte eine Einschätzung der Ernährungslage von Larven aus ausgewählten Seegebieten exemplarisch erfolgen und eine Prüfung der

"Verhungerungs- Hypothese" vorgenommen werden. Dabei sollte festgestellt werden, ob und in welchem Ausmaß Verhungern in See eine Rolle spielt und ob der Ernährungszustand von Heringslarven, die unter ökologisch unterschiedlichen Bedingungen aufwachsen, Unterschiede aufweist. Als Untersuchungsobjekt wurden Heringslarven des herbstlaichenden Bestandes nördlich von Schottland (Orkney- Shetland und Hebriden- Bestand), die bei hohen Planktondichten aufwachsen (SCHADT 1986), und des winterlaichenden Bestandes im Englischen Kanal, die bei geringen Futterdichten leben müssen (SCHADT 1986) ausgewählt. Dabei wurde von der Hypothese ausgegangen, daß der Ernährungszustand der Heringslarven aus dem Englischen Kanal im Vergleich zum Gebiet nördlich von Schottland im Mittel schlechter sein sollte. Zusätzlich wurden Heringslarven aus dem Nord-Ostsee-Kanal (mittlere Planktondichten) und aus der Schlei (hohe Planktondichten; NELLEN 1965, SCHNACK 1972) analysiert.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 ANALYTIK

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren analysenrein, bzw. von der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe. Ethidiumbromid (EB), Ribonukleinsäure (RNA) aus Hefe und Ribonuclease A (aus Rinderpankreas) wurden von der Firma Serva (Heidelberg) bezogen, Proteinase K und Natriumdodecylsulfat (SDS) von Merck (Darmstadt). Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus Kalbsthymus und Bisbenzimidazol (Hoechst 33258) wurden von der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen, Lambda-DNA und ribosomale RNA (r-RNA) von Boehringer (Mannheim).

#### 2.1.2 Nukleinsäurebestimmung aus Fischlarvenhomogenaten

##### 2.1.2.1 Extraktion und Reinigung der Nukleinsäuren

Basierend auf den Arbeiten von MANIATIS et al. (1982) wurde folgende Methode zur Extraktion und Reinigung der Nukleinsäuren entwickelt und an die Verhältnisse bei Fischlarven angepaßt: Gefrorenes Fischlarvenmaterial (-74 °C) diente als Ausgangsmaterial für die Analyse. Die Fischlarven wurden einzeln in einem "Potter Elvehjem" Mikrohomogenisator mit 0.4 ml Tris-EDTA Puffer im Eisbad homogenisiert (Abb. 2). Alle Arbeiten wurden bei 0 °C durchgeführt, um den RNase und DNase Einfluß zu minimieren.

Der verwendete Tris-EDTA Puffer wirkt nach BEERS & WITTLIFF (1975) Nukleinsäure-stabilisierend, da er die DNase Aktivität hemmt. Auch das Arbeiten bei pH  $\geq$  8 schränkt die DNase Aktivität ein (WOBUS 1980). Eine Salzkonzentration von 0.1 M NaCl ist erforderlich, um eine vollständige Dissoziation des Nukleoproteins von den Nukleinsäuren zu gewährleisten. Nach BENTLE et al. (1981) kann nur so die maximale Bindung zwischen EB und RNA bzw. DNA erfolgen. Das gesamte Homogenat wurde in ein 1.5 ml Eppendorf- Reaktionsgefäß überführt und mit 2 % SDS (w/v, Endkonzentration) 15 min geschüttelt, um die Dissoziation der Nukleoproteine von den Nukleinsäuren zu erreichen. Nach Zentrifugation (15 min, 3800x g) wurde der nukleinsäurehaltige Überstand abpipettiert und mit 400 µl Phenol (80 % w/v) zur

Zerstörung und Abtrennung der gewebeeigenen RNasen und DNasen und mit 400 µl Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1 v/v) versetzt. Das Sediment mit Gewebesubstanzen wurde verworfen. Die Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol Lösung wurde 10 min auf einem Eppendorf- Schüttler geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Es bildeten sich zwei deutliche Phasen, eine obere wässrige Nukleinsäurelösung und eine schwerere Phenol- Lösung mit den zu entfernenden zellulären Substanzen, die die Fluoreszenzmessung stören. Die obere nukleinsäurehaltige Phase wurde abpipettiert, mit Chloroform/ Isoamylalkohol versetzt, geschüttelt und dann zentrifugiert. Um Phenol- Spuren in der wässrigen Nukleinsäurelösung zu eliminieren, war zweimaliges Waschen mit Chloroform/ Isoamylalkohol erforderlich. Die Schritte des Nukleinsäure- Reinigungs- verfahrens sind im einzelnen dem Flußdiagramm in Abb. 2 zu entnehmen.

#### 2.1.2.2 Fluorimetrische Nukleinsäurebestimmung

Fluorimetrische Meßmethoden beruhen auf der Anregung eines Fluoreszenzfarbstoffes (Fluorophors) durch Licht einer bestimmten Wellenlänge und der Messung der vom Fluorophor emittierten Strahlung. In der Fluoreszenzphotometrie können im Vergleich zur Spektrophotometrie geringere Konzentrationen gemessen werden. Die Steigerung der Empfindlichkeit liegt bei etwa 100- 1000 fach. Extreme Sorgfalt und Sauberkeit sind bei Fluoreszenzmessungen erforderlich, da Spuren von kontaminierenden fluoreszierenden Substanzen die Messungen erheblich stören können. Um diese Fehlerquelle auszuschalten, war ein gründliches Reinigen der verwendeten Glasgeräte und Küvetten mit 65 %iger Salpetersäure nötig. Zwischen einzelnen Fluoreszenzmessungen war ein mehrfaches Spülen der Küvetten mit deionisiertem Wasser als Reinigungsmaßnahme ausreichend. Da die Fluoreszenzemission temperaturabhängig ist (GUILTBAULT 1973), - höhere Temperaturen führen zu einer Abnahme im Fluoreszenzsignal - war es erforderlich, bei konstanten Temperaturen zu arbeiten (25° C).

Eine Methode zur fluoreszenzphotometrischen Analytik der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Ribonukleinsäure (RNA) beruht darauf, DNA und RNA enthaltende Lösungen mit einem für sie spezifischen Fluorophor zu versetzen. Die Reaktion zwischen dem Fluorophor und den Nukleinsäuren führt zu einem meßbaren Fluoreszenzsignal. Für die geplanten Untersuchungen an Nukleinsäuren wurden die Fluoreszenzfarbstoffe *1,7 Diamino- 10- ethyl- 9- phenylphenanthridinium- bromid* nach KARSTEN & WOLLENBERGER (1972, 1977) (Ethidiumbromid = EB) und *2- [2-(4-hydroxyphenyl)- 6- benzimidazol]- 6-(1- methyl- 4- piperazyl)- benzimidazol- trihydrochlorid* (Bisbenzimidazol) verwendet. Ethidiumbromid lagert sich an Doppel-



strangbereichen aller Nukleinsäuren an (interkaliert) und bewirkt damit eine von der Menge aller Nukleinsäuren abhängige Fluoreszenzerhöhung (LePECQ & PAOLETTI 1966). KARSTEN und WOLLENBERGER (1972, 1977), PRASAD et al. (1972) sowie BEERS & WITTLIFF (1975) haben EB zum Nachweis von Nukleinsäuren in Zell- und Gewebehomogenaten verwendet. Bei **Bisbenzimidazol** handelt es sich um einen für DNA spezifischen Fluoreszenzfarbstoff, der bevorzugt an Adenin-Thymin Basenpaarbereichen interkaliert (LABARCA & PAIGEN 1980). Bisbenzimidazol reagiert nicht mit RNA, da die Base Thymin in der RNA durch Uracil ersetzt ist. Daher kann DNA unabhängig von RNA bestimmt werden. Der Einsatz von Bisbenzimidazol zum Nachweis von DNA in Zell- und Gewebehomogenaten wurde mehrfach beschrieben (BRUNK et al. 1979, CESARONE et al. 1979, DeFLAUN et al. 1986, LABARCA & PAIGEN 1980).

#### **Nachweis von RNA und DNA unter Verwendung der Fluoreszenzfarbstoffe EB und Bisbenzimidazol**

Zum Nachweis von RNA und DNA im Fischlarvengewebe wurde ein Aliquot der gereinigten Nukleinsäurelösung (siehe 2.1.2.1) mit EB versetzt und damit die Gesamtfluoreszenz ermittelt, die auf RNA und DNA zurückgeht. Ein zweites Aliquot wurde in einer weiteren unabhängigen Fluoreszenzmessung mit dem DNA-spezifischen Fluorophor Bisbenzimidazol versetzt. Die entsprechende DNA-Konzentration wurde aus einer DNA-Bisbenzimidazol Eichkurve ermittelt. Basierend auf dieser DNA-Messung konnte die entsprechende DNA-EB spezifische Fluoreszenz bestimmt werden. Die EB-Fluoreszenz, die auf den RNA-Gehalt zurückgeht, wurde durch Subtraktion der DNA-EB spezifischen Fluoreszenz von der Gesamt-EB Fluoreszenz (RNA + DNA) errechnet. Die dieser Fluoreszenz entsprechende RNA-Konzentration konnte aus einer RNA-EB Eichkurve ermittelt werden.

Die fluorimetrischen Messungen wurden am Kontron Spektrofluorometer SFM 25 mit temperierbarem Küvettenhalter bei 25 °C in Mikroküvetten durchgeführt. 0.6 ml Fischlarvennukleinsäurelösung wurde mit 0.05 ml EB-Lösung (0.1 mg/ml in aqua dest.) versetzt und die Fluoreszenz bei 365 nm Anregungs- und 590 nm Emissionswellenlänge bestimmt. Für die DNA-Bestimmung wurden 0.05 ml der Bisbenzimidazol Lösung (0.02 mg/ml in aqua dest.) zu 0.6 ml Fischlarvennukleinsäurelösung gegeben und die Fluoreszenz bei 352 nm Anregungs- und 448 nm Emissionswellenlänge gemessen. Die maximale Fluoreszenzintensität war nach weniger als einer Minute erreicht und blieb über eine Stunde lang konstant.

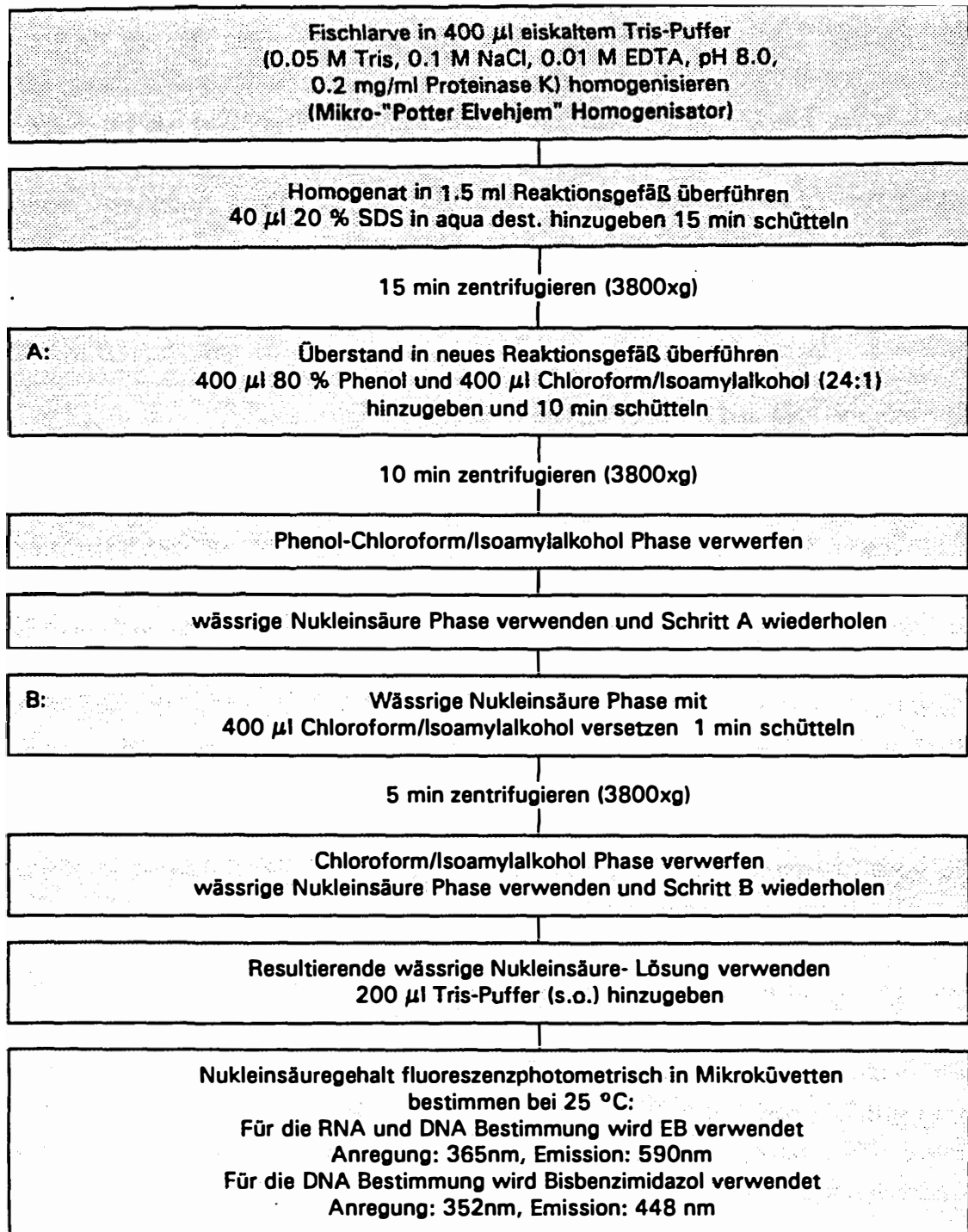


Abb. 2:

Flußdiagramm zur Extraktion, Reinigung und Messung von RNA und DNA mit EB (RNA + DNA) und Bisbenzimidazol (DNA).

DNA- Standards wurden mit verschiedenen EB- Konzentrationen versetzt und die resultierenden Komplexe fluorimetrisch gemessen. Bei Verwendung von EB- Konzentrationen von 0.0025, 0.05, 0.1 mg/ml kam es zu einer Fluoreszenzerhöhung mit zunehmenden EB- Mengen. Höhere EB- Konzentrationen hatten keine weitere Steigerung im Fluoreszenzsignal zur Folge. Für die weiteren Arbeiten wurde daher eine EB- Lösung von 0.1 mg/ml verwendet. Für den DNA-Bisbenzimidazol Nachweis wurden die höchsten Fluoreszenzsignale bei einer Konzentration von 0.02 mg/ml erzielt. Stammlösungen beider Fluoreszenzfarbstoffe konnten lichtgeschützt bei 4 °C vier Wochen gelagert werden, ohne Fluoreszenzverluste zu zeigen.

#### Nachweis von RNA und DNA mit EB und RNase

Neben der Bestimmung von DNA mit Bisbenzimidazol wurde die Wirksamkeit von Enzymen zum spezifischen Nukleinsäure- Abbau geprüft. Vorversuche zeigten, daß der enzymatische Abbau der RNA durch RNase im Vergleich zur DNase reproduzierbarer verläuft. Dabei ist die Herstellung DNase- freier RNase, eine Grundvoraussetzung für die Quantifizierung von RNA und DNA mittels enzymatischen Abbaus, einfacher als die Herstellung RNase- freier DNase. Ein Aliquot der gereinigten Larvennukleinsäurelösung wurde mit EB versetzt und die Nukleinsäuregesamtkonzentration (RNA + DNA) bestimmt. In einem weiteren Aliquot wurde RNA durch RNase abgebaut und die verbleibende intakte DNA konnte mit EB reagieren. Durch Subtraktion der DNA-EB Fluoreszenz von der (RNA + DNA)-EB Gesamtfluoreszenz ergab sich die RNA-EB spezifische Fluoreszenz, die über eine RNA-EB Eichkurve in RNA- Gehalte umgerechnet werden konnte.

Um sicherzustellen, daß die verwendete RNase frei von DNase war und damit die in der Probe vorhandene DNA nicht angreifen konnte, wurde nach einer Vorschrift von MANIATIS et al. (1982) gearbeitet. RNase wurde in 10 mM Tris-HCl mit 15 mM NaCl (pH 7.5) gelöst und 15 min bei 100 °C erhitzt. Die DNase wird so zerstört, die RNase bleibt aktiv. Die RNase- Lösung wurde dann bei Raumtemperatur langsam abgekühlt und bis zur Verwendung, in Aliquots aufgeteilt, bei -20 °C gelagert.

Zur Bestimmung der jeweiligen Nukleinsäurekonzentrationen sind DNA-Bisbenzimidazol-, DNA-EB- und RNA-EB Eichkurven erforderlich. Zur Herstellung der Eichlösungen wurden DNA aus Kalbsthymus (Sigma) und RNA aus Hefe (Serva) verwendet. Konzentrationen von 0.1- 3 µg Nukleinsäuren / 650 µl Tris-EDTA Puffer wurden zu je 4 Parallelen angesetzt.

Bei den angegebenen Fluoreszenzen beider Methoden handelt es sich immer um korrigierte Werte (RF), die sich aus der Subtraktion von Gewebeeigenfluoreszenz (GewebeEF; ohne Fluoreszenzfarbstoff) und Farbstoffeigenfluoreszenz (FarbstoffEF) von der am Gerät abgelesenen Gesamtfluoreszenz (GF) errechnen lassen:

$$RF = GF - (GewebeEF + FarbstoffEF)$$

### 2.1.2.3 Agarosegel Elektrophorese

Um den Einfluß des Extraktions- und Reinigungsverfahrens auf den Zustand der Nukleinsäuren hinsichtlich Reinheit und Molekülgröße zu ermitteln, wurden die gereinigten Fischlarvennukleinsäure-Lösungen gelelektrophoretisch dargestellt.

Die zu untersuchenden gereinigten Fischlarvennukleinsäuren wurden in 0.8 %igem Agarosegel in Tris-EDTA-Natriumacetat-Puffer (TAE-Puffer) aufgetrennt. Zum Vergleich wurden parallel DNA-Größenstandards (Lambda-Hind III- und AccI-Fragmente, Boehringer Mannheim) zur Molekulargewichtsbestimmung eingesetzt. Zur Detektion der Nukleinsäuren im Gel wurden die Agarosegele in Ethidiumbromidlösung gefärbt. Die im UV Durchlicht (254 nm) sichtbaren Nukleinsäurebanden wurden dann abphotographiert. Einzelheiten dieser Methode sind bei NEVE (1985) beschrieben.

## 2.2 LABORAUFZUCHT DER FISCHLARVEN

### 2.2.1. Befruchtung und Inkubation

#### Hering (*Clupea harengus* L.)

Die Beschaffung von laichreifen Heringen war in Institutsnähe von März bis Mai möglich, da Bestände des Frühjahrsherings in der Kieler Innenförde und im Nord-Ostsee-Kanal laichen. Für den Erbrütungsansatz im Frühjahr 1986 wurden Laichheringe aus Bundgarnfängen aus dem Nord-Ostsee-Kanal in der Nähe der Rendsburger Hochbrücke verwendet. Die Gewinnung der Gameten und die Befruchtung wurde am Fangort durchgeführt. Als Befruchtungsgefäß diente eine Kunststoffwanne von 50 l Inhalt, die mit Glasplatten (17 cm x 17 cm) als Substrat für die haftenden Heringseier ausgelegt wurde. Die Heringseier stammten von Laichfischen, die am 06.05.86 gefangen wurden. Die Eier wurden vorsichtig aus den Gonaden gedrückt und ein-

schichtig auf die Glasplatten verteilt. Das Sperma wurde zunächst in ein Becherglas abgestreift, mit Ostseewasser verdünnt und anschließend über die Eier gegeben. Versuche von BAHRS (1981) ergaben, daß nach 10 min eine Befruchtung zu 100 % erfolgt ist. Nach dieser Zeitspanne wurden die belegten Glasplatten mit Kanalwasser gespült, um überschüssiges Sperma zu entfernen. Die Eiplatten wurden bei ständigem Wasserdurchfluß in der 50 l Wanne an Bord der Forschungsbarkasse "Sagitta" zum Labor transportiert.

Die Heringseier für den Versuchsansatz im Frühjahr 1989 stammten wieder aus Bundgarnfängen aus dem Nord-Ostsee-Kanal. Die Gewinnung der Gameten fand jedoch erst im Labor statt. Die laichreifen Heringe wurden am 06.04.89 in Transportkisten auf Eis zum Labor gebracht. Die Befruchtung erfolgte wie oben beschrieben. Der Befruchtungserfolg in allen Ansätzen lag bei 95 %.

#### Erbrütungsbedingungen

Die belegten Glasplatten wurden zur Erbrütung in ein 30 l und in ein 35 l Glas-aquarium vertikal und im Abstand von jeweils 2 cm eingehängt. Die Becken wurden mit Ostseewasser aus dem Ostseewasserkreislauf des Schauaquariums des Instituts für Meereskunde in Kiel (Salinität 15 ‰, Aufzucht 1986), bzw. der direkten Ostseewasserleitung (Salinität 15-16 ‰, Aufzucht 1989) gefüllt und in einem temperaturkonstanten Raum bei 10 °C aufgestellt. Die Belüftung erfolgte über 30 cm lange Belüftungsstäbe, für die Beleuchtung wurde ein 9 Stunden Hell-/ 15 Stunden Dunkelrhythmus gewählt (Aufzucht 1986), bzw. Dauerlicht (Aufzucht 1989). Bei der Aufzucht 1989 wurde kurz vor dem Schlupftermin auf 9 Stunden Hell-/ 15 Stunden Dunkelrhythmus umgestellt, da der Schlupfvorgang durch hohe Lichtintensität gehemmt wird und daher vorwiegend in den Nachtstunden stattfindet (ALDERDICE & VELSEN 1971). Die Eientwicklung wurde an Eiern, die auf Petrischalen erbrütet wurden, kontrolliert. Gleichzeitig wurden Proben der Eier vier Tage und einen Tag vor dem Schlupf, sowie am Schlupftag, genommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse der RNA/DNA Verhältnisse bei -74°C gelagert. Dabei sollte anhand der RNA/DNA Bestimmungen der physiologische Zustand der Heringseier im Vergleich zu den später aus den Eiern schlüpfenden Larven untersucht werden. Die Inkubationszeit bis zum ersten Schlüpfen der Larven betrug während der 1986er Aufzucht 10 Tage bei 10 °C. Der Massenschlupf der Larven erfolgte am 12. Inkubationstag. Dieser Tag wurde als erster Tag nach dem Schlupf definiert. Während der 1989er Aufzucht herrschte eine Temperatur von 9.2 °C in den Erbrütungsbecken, die

zu einer Verlängerung der Entwicklungszeit führte. Der 1. Schlupf begann am 12. Tag nach der Befruchtung, der Massenschlupf erfolgte am 15. Inkubationstag. Zur Bestimmung des Schlupferfolges wurde eine definierte Fläche auf den Glasplatten auf leere Eihüllen, abgestorbene und nicht befruchtete Eier ausgezählt und hochgerechnet. Der Schlupferfolg lag bei 75 %.

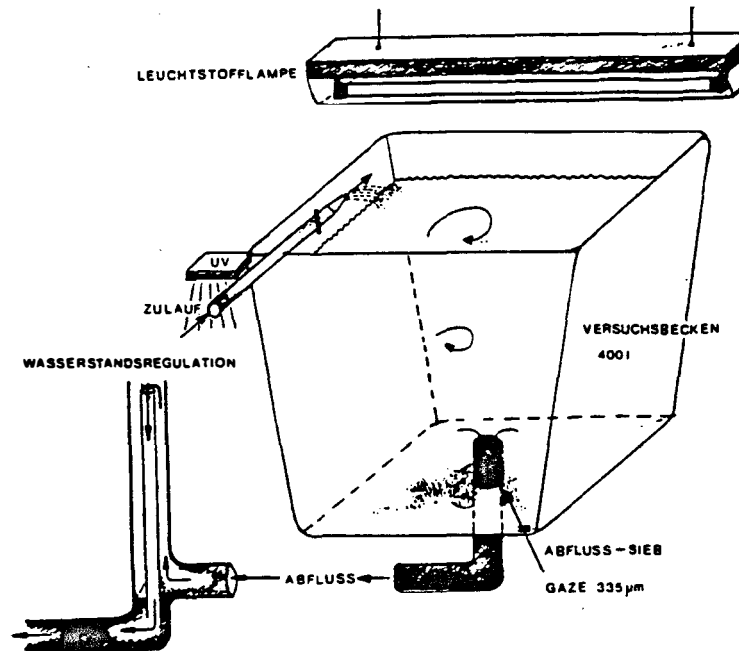
#### **Steinbutt (*Scophthalmus maximus*)**

In einer ehemaligen Außenstelle für Aquakulturforschung des Instituts für Meereskunde in Kiel-Bülk (jetzt im Besitz der Firma Butt) werden seit 1979 Steinbutts bis zur Laichreife aufgezogen und standen dort auch für diese Arbeiten zur Verfügung. Ein Weibchen und 2 Männchen des Ostseesteinbutts wurden am 24.06.86 in Kiel- Bülk abgestreift. Die Erbrütung der Eier erfolgte in einer Unterstromapparatur bei 18 °C (KUHLMANN et al. 1981). Am 4. Inkubationstag erfolgte ein Transport der Eier ins Labor nach Kiel und ein Umsetzen in die Erbrütungsbecken mit einer Temperatur von 14.7 °C. Die Larven schlüpften am 6. Erbrütungstag. Der Schlupferfolg betrug ca. 30 %.

#### **2.2.2 Larvenhälterung**

##### **Heringslarvenaufzucht 1986**

Nach dem Schlupf erfolgte das Umsetzen der Larven in eine für diesen Versuch aufgebaute Aufzuchtanlage. Die Anlage bestand aus vier 400 l und neun 75 l in zwei Reihen übereinander angeordneten Becken aus grünem GFK mit einer Grundfläche von 90 x 90 cm, bzw. 50 x 50 cm mit abgerundeten Ecken. Der Wasserstand im Tank wurde durch ein äußeres Standrohr reguliert. Der Abfluß befand sich in der Mitte des Beckenbodens. Das Abflußrohr war mit großen Bohrungen versehen und mit Gaze von 335 µm Maschenweite beklebt, um das Ausspülen von Larven zu verhindern (Abb. 3). Die 13 Becken wurden im Durchflußsystem mit Ostseewasser aus dem Schauaquariumskreislauf versorgt. Vor Eintritt in das erste Becken wurde das Wasser über 50 µm Gaze gefiltert und zur Verringerung der Keimzahl an einer UV- Lampe (30 Watt, Firma Wiegand) vorbeigeleitet. Der Wassereinlauf in die Versuchsbecken erfolgte knapp über der Wasseroberfläche. So wurde eine Kreisströmung in den Becken erzeugt, die die Akkumulation der Larven in den Tankecken und an den Wänden verhindern sollte. Außerdem wurde durch die dabei entstehende Bewegung der Wasseroberfläche die Bildung einer Kahmhaut vermieden (Abb. 3).



**Abb. 3:**  
Schematischer Aufbau eines der Versuchsbecken für die Fischlarvenaufzucht

### Heringslarvenaufzucht 1989

Die Larvenhälterungsanlage bestand aus den gleichen 13 Becken wie im Aufzuchtversuch 1986. Um eine bessere Temperaturkonstanz in den 75 l- Becken zu erhalten, wurden diese in ein 2000 l Kunststoffbecken, gefüllt mit Ostseewasser, gehängt. Diese Wasserummantelung der kleinen Becken sollte einen schnellen Temperaturangleich an die schwankende Lufttemperatur im Aufzuchtsraum verhindern. Die Aufzuchtanlage wurde im Durchflußsystem mit Wasser direkt aus der Ostsee versorgt. Vor Eintritt in die Aufzuchtbecken wurde das Ostseewasser über zwei BADU- Schutzfilter (Typ SF, Schwimmbadfilter) mit 50 µm und anschließend über 5 µm Porengröße gefiltert und dann mit UV- Licht bestrahlt. Der Wassereinstrom konnte für jedes Becken getrennt geregelt werden. Der Wasserzufluß eines 75 l Beckens wurde über einen Kryostaten geleitet, um eine niedrigere Temperatur in diesem Becken im Vergleich zur Gesamtanlage zu ermöglichen. Dort erfolgten Versuche zum Einfluß der Temperatur auf das RNA/DNA Verhältnis der Larven.

### **Steinbuttlarvenaufzucht 1986**

Die Hälterung und Aufzucht der Steinbuttlarven erfolgte 1986 in der Aufzuchtanlage, die auch für die Heringslarven benutzt worden war.

## **2.2.3 Abiotische Bedingungen in den Hälterungsanlagen**

### **Wasserdurchflußrate**

Die Wasserdurchflußrate während der Heringslarvenaufzucht 1986 betrug 58 l/h. Damit wurde die dem Gesamtvolumen in der Aufzuchtanlage entsprechende Wassermenge innerhalb von 39 Stunden dem System zugeführt. So konnte einerseits eine sehr gute Wasserqualität sichergestellt und andererseits ein zu großer Verlust an Futterorganismen über den Ablauf vermieden werden. Während der Aufzucht 1989 wurden die Heringslarven während der ersten 6 Tage bei stehendem Wasser gehältert. Die danach eingestellten Bedingungen entsprachen denen der Aufzucht 1986.

### **Beleuchtungsverhältnisse**

Die Becken wurden mit weißen Neonleuchtstoffröhren (Phillips TL 65W/25) 15 h pro Tag beleuchtet. Die Lichtstärke an der Wasseroberfläche wurde mit einem Luxmeter (Li-Cor Inc., Typ Li 188-B integrating quantum/ radiometer/ photometer) gemessen und betrug zwischen 200 und 570 Lux. Die Abstände und Einstrahlungswinkel über den Becken wurden möglichst gleich gehalten. Diese Bedingungen wurden bei allen Aufzuchtversuchen eingehalten.

### **Wasserqualität**

Aufgrund der Ergebnisse zur Bestimmung der Wasserqualität während einer vergleichbaren Heringslarvenaufzucht 1984 (CLEMMESSEN 1985) wurde auf eine Überwachung der Parameter Sauerstoff, Ammonium und pH-Wert bei den beschriebenen Aufzuchtversuchen verzichtet. Während einer Heringslarvenaufzucht 1984 hatte sich erwiesen, daß die Wasserqualität in allen gemessenen Parametern den Anforderungen für eine erfolgreiche Fischlarvenaufzucht entsprach.

### **Temperaturverlauf**

Die Temperatur in den Aufzuchtbecken wurde täglich gemessen. Der Mittelwert der Messungen für den jeweiligen Versuchstag der drei beschriebenen Aufzuchten ist in



Abb. 4 wiedergegeben. Die absoluten Temperaturen lagen während der Steinbuttlarvenaufzucht infolge der fortgeschrittenen Jahreszeit (Juli-August) etwas höher als bei den Heringslarvenaufzuchten.

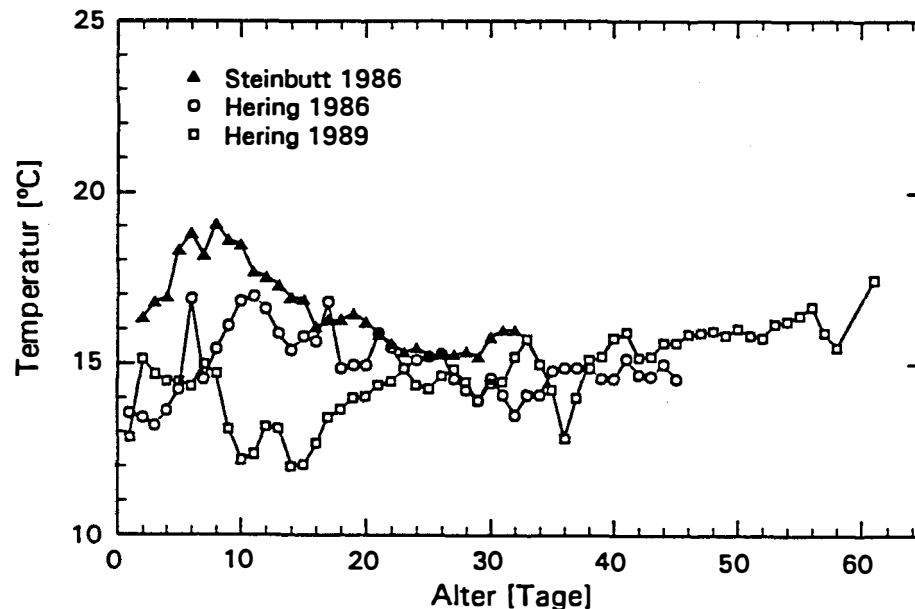


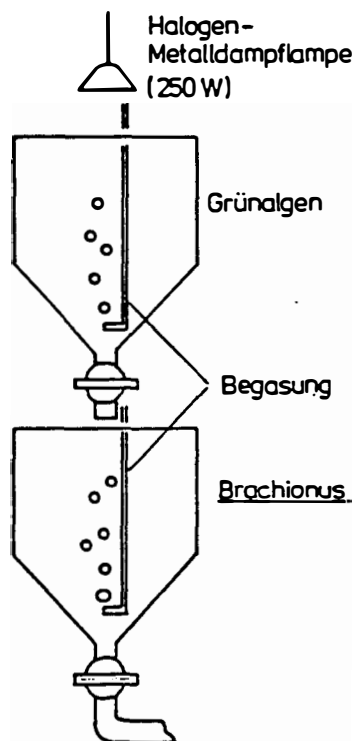
Abb. 4:

Temperaturverlauf in den Larvenhälterungen als Mittelwert aus allen Versuchsbecken für die Heringslarvenaufzucht 1986, 1989 und die Steinbuttlarvenaufzucht 1986.

#### 2.2.4 Fütterung der Fischlarven

Als Larvenfutter für Herings- und Steinbuttlarven wurden ausschließlich Rotatorien (*Brachionus plicatilis*) und frischgeschlüpfte Nauplien von *Artemia spec.* verwendet. Die Hälterung der Rotatorien und der für sie als Futter verwendeten Grünalgen (*Nannochloris spec.*) erfolgte bei 25.5 °C in zwei übereinanderstehenden, ca. 275 l fassenden, runden, am Boden konisch zulaufenden Plexiglasbecken mit einem Abfluß in der Bodenmitte ("Silo- Anlage", Abb. 5). Dadurch konnte aus dem hoch stehenden Algenbecken direkt ein Teil der Kultur zur Fütterung in das darunter stehende Rotatorienbecken abgelassen werden. Die Grünalgen wurden bei einem 15 h Lichttag (Halogenmetalldampfampe, FS Leistungsstrahler 250 W, Typ 412/252) kultiviert. Ein 30 cm langer Belüftungsstab sorgte für Turbulenz und CO<sub>2</sub>-Eintrag. Die Anreicherung

der Algenkultur erfolgte durch Düngung mit "Nitrophoska Blau" (WITT et al. 1981). Zur Fütterung der Rotatorienkultur wurde etwa ein Drittel der Algensuspension täglich abgeerntet. Die Rotatorienkultur wurde bei einem 15 h Lichttag und 25.5 °C gehältert und wurde zur Fütterung der Heringslarven über ein 50 µm Sieb abgeerntet. Eine Stunde vor der Verfütterung an die Fischlarven wurden die Rotatorien mit frischer Grünalgensuspension versorgt.



**Abb. 5:**  
Schematische Darstellung der "Silo-Anlage" zur Hälterung von Rotatorien und Grünalgen.

*Artemia* Eier ("high quality San Francisco Brand") wurden in einem 40 l Gefäß bei 25 °C in Nordseewasser (33 ‰) erbrütet und innerhalb von einigen Stunden nach dem Schlupf an die Fischlarven verfüttert.

Die Fütterung der Fischlarven erfolgte täglich und wurde im Alter von einem Tag bei allen Aufzuchten mit *Brachionus plicatilis* begonnen. Die Zugabe von Futter erfolgte zeitlich vor der Resorption des Dotters, da nach GADOMSKI & PETERSEN (1988) die Überlebensrate von Fischlarven höher ist, wenn das Futter frühzeitig angeboten wird.

Da Rotatorien als alleinige Nahrungsquelle für ältere Heringslarven nicht mehr ausreichend sind, wurden ab dem 16. Tag (Heringslarvenaufzucht 1986, Abb. 6) bzw. dem 19. Tag (Heringslarvenaufzucht 1989, Abb. 7) *Artemia*-Nauplien zugefüttert. Im Vergleich zur Heringslarvenaufzucht 1986, in der vom 28. Tag nur noch *Artemia*-Nauplien gegeben wurden, erfolgte in der Heringslarvenaufzucht 1989 die Fütterung mit *Brachionus* zusätzlich zu *Artemia*-Nauplien während des gesamten Versuchszeitraumes (1.-65. Tag).

Den Steinbuttlarven der Aufzucht 1986 wurden vom 1.-16. Tag *Brachionus plicatilis* angeboten. Nach dem 11. Tag wurden zusätzlich *Artemia*-Nauplien verfüttert. Vom 16. Tag bis zum Versuchsende (27. Tag) erfolgte die Fütterung nur noch mit *Artemia*-Nauplien (Abb. 8).

In allen Versuchen erfolgte die Fütterung der Larven mit *Artemia* zeitlich verzögert nach vorheriger *Brachionus*-Fütterung.

#### Futterdichten

Durch Einstellen einer leichten Kreisströmung wurde versucht, die Futterdichte im gesamten Fischlarvenaufzuchtbecken möglichst homogen zu halten. Dennoch ließen sich Ansammlungen von Futterorganismen an den Beckenwänden und unterhalb der Lichtquellen nicht vermeiden. Zur Bestimmung der Futterdichten in den Fischlarvenaufzuchtbecken wurden täglich drei Wasserproben aus den Becken (eine am Rand, zwei in der Beckenmitte) entnommen und die Anzahl der Nahrungsorganismen mit einem Binokular ausgezählt und gemittelt. Die Rotatoriendichte in der *Brachionus*-Kultur (Silo-Anlage) wurde durch Auszählen von drei Unterproben bestimmt. Unter Berücksichtigung der Anzahlen der noch im Fischlarvenaufzuchtbecken vom Vortage verbliebenen Futterorganismen wurde die Menge Rotatorienkultur dem Larvenaufzuchtbecken zugeführt, die zum Einstellen der jeweiligen Futterdichten benötigt wurde (Heringslarvenaufzucht 1986).

Bei der Heringslarvenaufzucht 1989 wurde die Organismendichte in der Rotatorienkultur bestimmt und die der im Versuchsbecken erwünschten Futterdichte entsprechende Kulturmenge an die Fischlarven verfüttert, ohne Berücksichtigung der noch im Aufzuchtbecken vom Vortag verbliebenen Futtertierkonzentration. Auf eine Auszählung dieser Restorganismenzahlen in den Fischlarvenaufzuchtbecken wurde wegen der großen Variabilität zwischen den Bestimmungen bei der Heringslarven-

aufzucht 1986 verzichtet. Weiterhin kann davon ausgegangen werden, daß sich die im Aufzuchtbecken verbliebenen Rotatorien aufgrund der in ihrem Verdauungstrakt fehlenden Grünalgen in einem energetisch schlechteren Zustand befanden. Daher ist eine Auszählung der verbliebenen Nahrungsorganismen nicht sinnvoll, da sie nicht mehr als adäquates Futter angesehen werden können. Sie wurden daher für die Futterdichte-Einstellung nicht mehr berücksichtigt.

Für die Fütterung mit *Artemia* wurden die frischgeschlüpften Nauplien mit einer Lichtquelle konzentriert und über einen Schlauch aus dem Erbrütungsbecken in einen 1 Liter Meßkolben abgesaugt. Durch Auszählen von drei Unterproben aus diesem Meßkolben wurde die Artemiendichte ermittelt und dann die den gewünschten Futterdichten entsprechenden Mengen den Aufzuchtbecken zugeführt.

Während der Heringslarvenaufzucht 1986 wurde eine Futterdichte von 3.0 *Brachionus* + 0.5 *Artemia*/ml eingestellt. Bei der Heringslarvenaufzucht 1989 wurden Versuche bei zwei verschiedenen Futterdichten durchgeführt. Aufgrund von Ergebnissen von WERNER & BLAXTER (1980, 1981) und SCHNACK (1981) wurden Futterdichten von 5.0 *Brachionus* + 1 *Artemia*/ml als hoch und 0.1 *Brachionus* + 0.01 *Artemia*/ml als niedrig definiert. Bei diesen Versuchen sollte untersucht werden, inwieweit die Futterdichte das RNA/DNA Verhältnis der Fischlarven beeinflussen kann.

Bei der Steinbuttlarvenaufzucht 1986 wurde eine Futterdichte von 2.0 *Brachionus* + 0.5 *Artemia*/ml eingestellt.

## 2.2.5 Versuchsaufbau und Probennahme

### Hering

Am 1. Versuchstag wurden die Becken der Hälterungsanlage gleichmäßig mit frischgeschlüpften Heringslarven besetzt. Die genaue Besatzdichte wurde während der Heringslarvenaufzucht 1986 nicht ermittelt. Larven aus einem 400 Liter Aufzuchtbecken dienten als Reserve und wurden während des Versuchszeitraums in 75 l Becken für Hungerexperimente eingesetzt. Der Versuchsaufbau mit den Probennahmeterminen ist in Abb. 6 schematisch dargestellt.

Die aus den Aufzuchtbecken entnommenen Larven wurden sofort nach der Probenahme in Eppendorf- Reaktionsgefäße (1.5 ml) überführt und mit entionisiertem

Wasser gespült, um Salz zu entfernen. Mehrere Reaktionsgefäße wurden in einer Polyethylenflasche (100 ml) bis zur Bestimmung der Nukleinsäuregehalte bei  $-74^{\circ}\text{C}$  gelagert, da für die Langzeitaufbewahrung des Untersuchungsmaterials zur späteren RNA- und DNA- Bestimmung eine Lagerung bei  $-74^{\circ}\text{C}$  empfohlen wird (DAVIS et al. 1980, BUCKLEY & BULOW 1987). Bei  $-20^{\circ}\text{C}$  kommt es zu zahlreichen Brüchen in den DNA Molekülen, die zu erheblichen Verlusten bei der DNA- Bestimmung führen können (FERGUSON & DRAHUSHCHAK 1989).

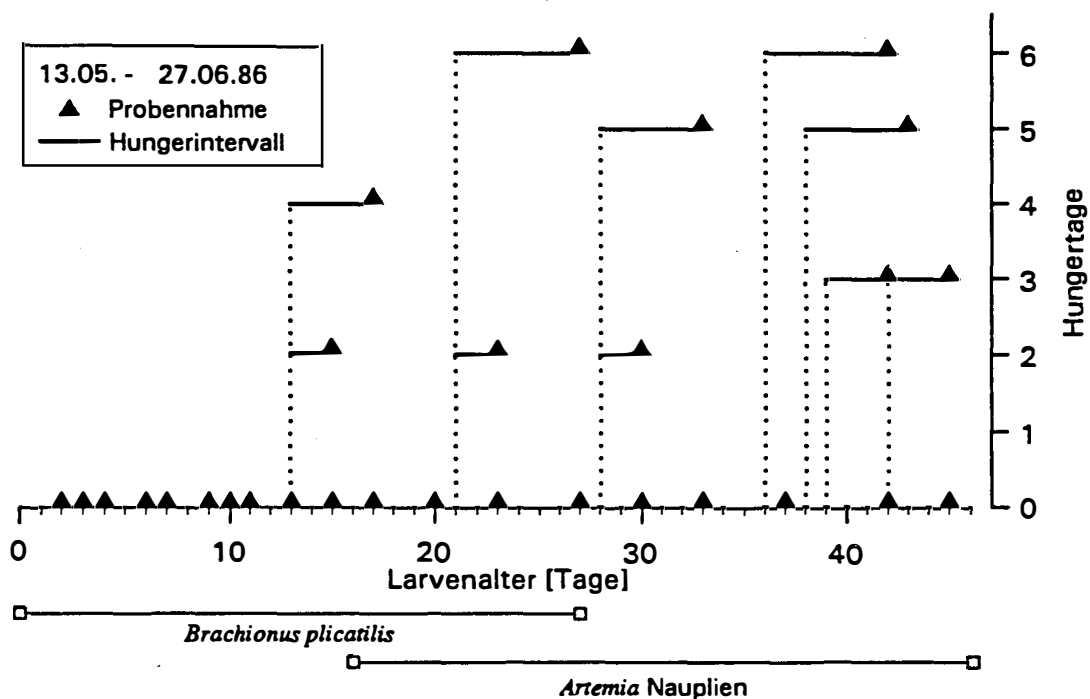


Abb. 6:

Probennahmeschema und Futterbedingungen bei der Heringslarvenaufzucht 1986. Die Dreiecksymbole markieren die Probennahmen und zeigen das Alter der entnommenen Fischlarven.

Um eine gleichmäßigere Futterdichte in den Aufzuchtbecken zu gewährleisten, wurden bei der Heringslarvenaufzucht 1989 Becken mit geringem Volumen für die Futterdichteversuche genutzt. Die 400 l Becken enthielten lediglich das Reserve- Larvenmaterial. In den 75 l Becken wurde eine Larvendichte von 13 Larven/ Liter eingestellt. Für die Hungerexperimente war zur Deckung des Materialbedarfs eine Larvenbesatzdichte von 4 Larven/ Liter ausreichend. Nach Beendigung eines Versuchs erfolgte ein erneutes Einsetzen von Larven in die Versuchsbecken aus den Reservebecken. Der

Versuchsverlauf der Heringslarvenaufzucht 1989 und die Probennahmetermine sind in Abb. 7 dargestellt.

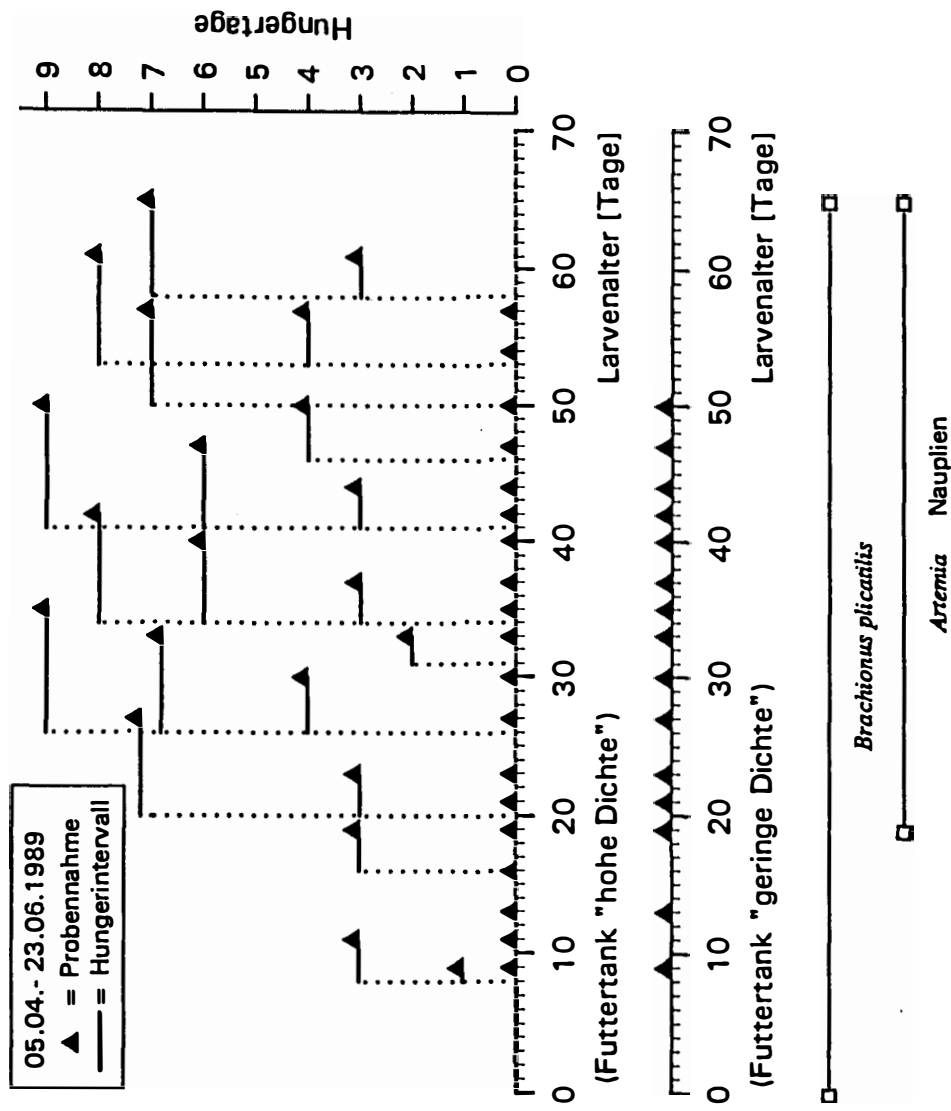


Abb. 7:

Probennahmeschema während der Heringslarvenaufzucht 1989. Dreieckssymbole markieren die Probennahmen in den beiden Futtergruppen und zeigen das Alter der zum Hungerversuch entnommenen Fischlarven.

#### Wiederanfütterungsversuche

Ziel dieser Versuche war es festzustellen, in welcher zeitlichen Skala sich das RNA/DNA Verhältnis von Heringslarven, die gehungert hatten, nach Wiederaanfütterung auf das Niveau von gefütterten Larven einstellt. Dazu wurden Larven, die vier Tage gehungert hatten, wieder gefüttert und in mehrtäglichem Abstand beprobt.

### Reaktion des RNA/DNA Verhältnisses auf Futteraufnahme im Verlaufe eines Versuchstages

Um den Einfluß der Futteraufnahme auf das RNA/DNA Verhältnis zu untersuchen, wurde geprüft, ob sich Veränderungen der Ernährungslage im Bereich von Stunden über die Messung des RNA/DNA Verhältnisses erfassen lassen. Dazu erfolgten Probennahmen vor der Fütterung und nach der Fütterung in zweistündigem Abstand an 30, 37 und 42 Tage alten Heringslarven, die täglich Futter erhalten hatten. Die Fütterung mit *Brachionus* erfolgte um 9.30 Uhr, die mit *Artemia* Nauplien um 15.00 Uhr, da sie erst zu diesem Zeitpunkt in Massen geschlüpft waren.

### Temperatureinflüsse

Stoffwechselaktivitäten sind abhängig von der vorherrschenden Umgebungstemperatur. Jede Spezies hat einen Temperaturbereich, in dem ihr Stoffwechsel mit maximaler Geschwindigkeit abläuft. Weicht die Umgebungstemperatur von diesem Temperaturbereich ab, so ändert sich die Stoffwechselrate. Es ist daher denkbar, daß die Temperatur einen Einfluß auf die Proteinbiosynthese und damit auf das RNA/DNA Verhältnis haben könnte. Zur Überprüfung dieses möglichen Temperatureinflusses wurden Heringslarven ab einem Alter von 28 Tagen in einem auf 10 °C gekühlten 75 l Tank gehältert. Mit der Probennahme wurde am 30. Tag begonnen, als sich im Aufzuchtbecken im Mittel eine Temperatur von  $11.0 \pm 0.9$  °C eingestellt hatte. Aufgrund von Defekten an der Kühlanlage mußte der Temperaturversuch nach einer Woche abgebrochen werden. Daher liegen nur Ergebnisse zum Temperatureinfluß von Larven der Altersgruppe 30-37 Tage nach dem Schlupf vor.

### Steinbutt

Steinbuttlarven wurden in Besatzdichten von 13-20 Larven/ Liter in die Aufzuchtbecken eingesetzt und bei einer Futterdichte von 2.0 *Brachionus* + 0.5 *Artemia*/ml gehältert. Ab einem Alter von 8 Tagen wurden die Larven für Hungerexperimente aus den Futtertanks in futterfreie Aufzuchtbecken umgesetzt und Hungerintervallen von 2-6 Tagen ausgesetzt. Die schematische Darstellung des Versuchsverlaufs und der Probennahmetermine zeigt Abb. 8.

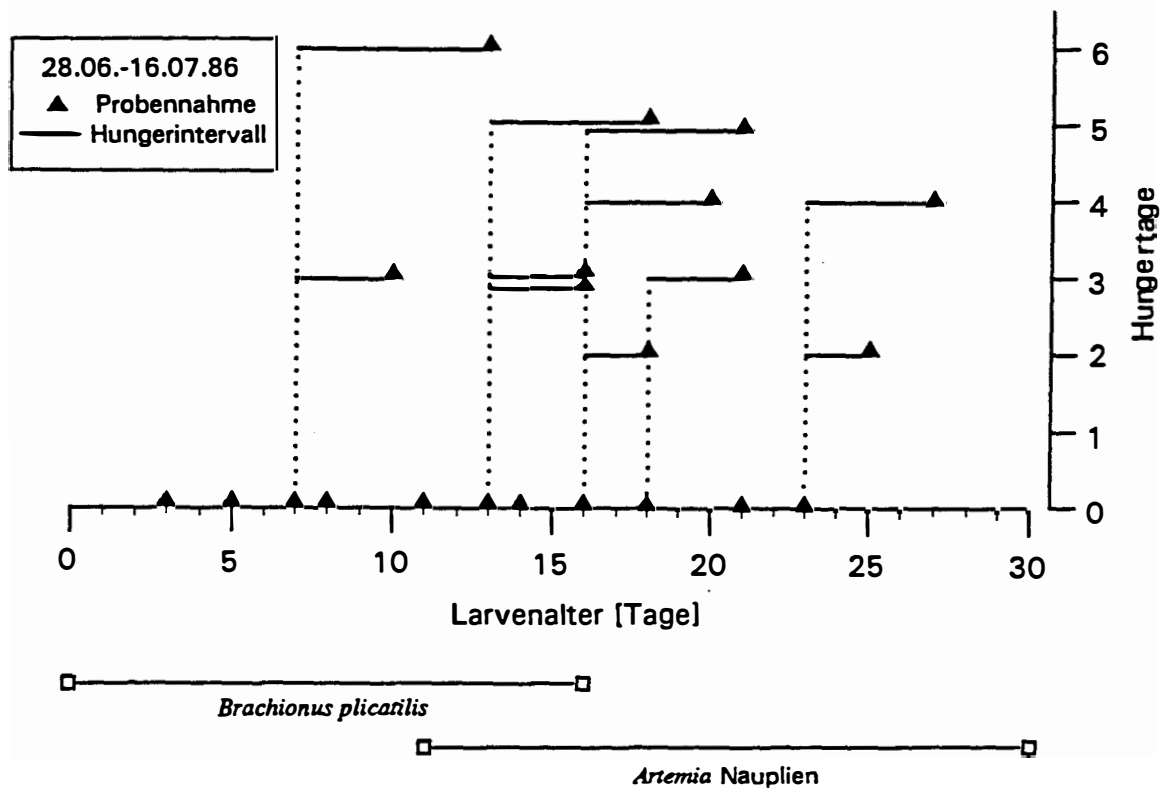


Abb. 8:

Probennahmeschema während der Steinbuttlarvenaufzucht 1986:

Dreiecksymbole markieren die Probennahmen in der Futtergruppe und zeigen das Alter der zum Hungerversuch entnommenen Fischlarven.

## 2.3 FELDUNTERSUCHUNGEN AN HERINGSLARVEN

### 2.3.1 Fanggebiete und Fanggeräte

Bei der Gewinnung des Materials für die feldbiologischen RNA/DNA Untersuchungen stand der Vergleich des Ernährungszustandes von Larven aus ökologisch unterschiedlichen Gebieten im Vordergrund. Dazu wurden Heringslarven des herbstlaichenden Bestandes nördlich von Schottland (Orkney-Shetland und Hebriden) und des winterlaichenden Bestandes aus dem Englischen Kanal analysiert. Zusätzlich sollte eine stichprobenmäßige Erfassung des Ernährungszustandes von Heringslarven aus der Schlei und dem Nord-Ostsee-Kanal erfolgen. Die Schlei ist einer der wichtigsten

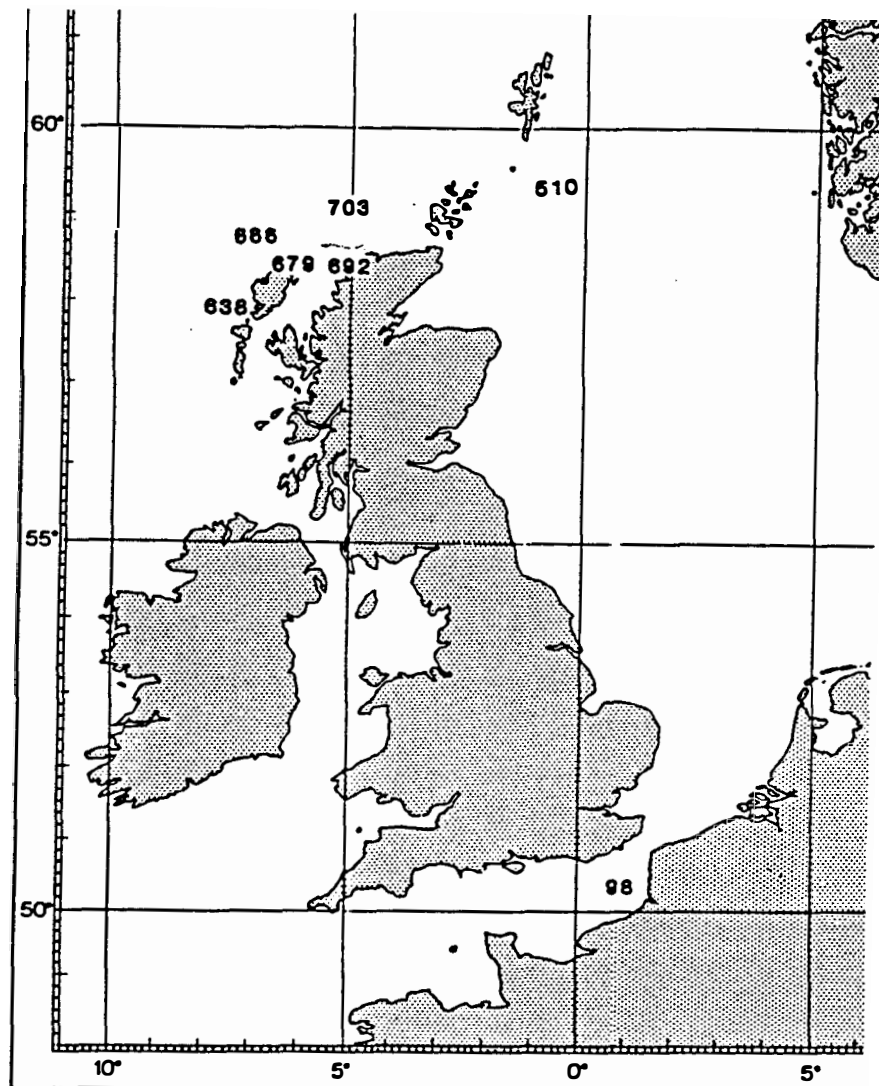


Laichplätze des Frühjahrsherings der westlichen Ostsee, die sich durch extrem großen Nährstoffreichtum und hohe Planktondichten auszeichnet (NELLEN 1965, SCHNACK 1972). Im Englischen Kanal müssen die Heringslarven dagegen im Winter aufwachsen, wenn die Konzentration potentieller Nährtiere sehr gering ist (SCHADT 1986). Der Nord-Ostsee-Kanal und das Gebiet nördlich von Schottland nehmen in Bezug auf die Nährtierkonzentration eine Mittelstellung ein (SCHADT 1986, SCHNACK 1972).

Das Sammeln von in situ aufwachsenden Fischlarven erfolgte im Rahmen der Heringslarvenuntersuchungen des Internationalen Rates für Meeresforschung (ICES). Während einer Reise mit dem F.S. "Anton Dohrn" vom 18.01 - 29.01.1986 in die südliche Nordsee wurden für die vorliegende Arbeit Heringslarven auf einer Dauerstation (vom 25.01.86 - 26.01.86) in der Flämischen Bucht gefangen. Im Seegebiet der Orkney-Shetland Inseln und der Hebriden wurden auf einer Reise mit dem F.S. "Poseidon" vom 04.09. - 28.09.86 Heringslarven gesammelt. Abb. 9 zeigt die in den Untersuchungsgebieten befischten Stationen. Parallel zu den Untersuchungen im Englischen Kanal und in der Nordsee wurden Heringslarven am 19.05.89 und 24.05.89 von Bord der Forschungsbarkasse "Sagitta" im Nord-Ostsee-Kanal bei Breiholz (Kanalkilometer 50, Salinität 3.2 ‰) gefangen. Eine Beschaffung von Heringslarven aus der Schlei erfolgte am 01.06.89 und 07.06.89 bei Lindaunis vom Ufer aus.

Als Fanggeräte für die Probennahmen in der nördlichen Nordsee und im Englischen Kanal wurden ein vertikal fangendes Helgoländer Larvennetz (HLN) mit 300 µm Maschenweite und ein horizontal, diskret in verschiedenen Wassertiefen fangendes MOCNESS-Gerät (Maschenweite 335 µm; WIEBE et al. 1976) eingesetzt. Die Sammlung von Heringslarven aus dem Nord-Ostsee-Kanal erfolgte mit einem Bongo-Netz (Maschenweite 300 µm). Heringslarven aus der Schlei wurden mit einem Senknetz (1m x 1m) vom Ufer aus gefangen. Die Larven wurden lebend nach Kiel transportiert und in Laborexperimenten eingesetzt.

Die Fischlarven wurden mit den verwendeten Fanggeräten ohne Beschädigung gesammelt, da kurze Hol-Zeiten eingehalten wurden und auf ein Spülen der Netze zur quantitativen Erfassung der Fischlarven verzichtet wurde (Fangzeiten: HLN ca. 3-8 min, MOCNESS ca. 5-10 min, Bongo ca. 3-5 min). Das Plankton wurde aus dem Netz sofort in einen Eimer mit Eiswürfeln überführt. Die mitgefangenen Heringslarven wurden mit Pasteurpipetten mit erweiterten Spitzen aus dem Fang sortiert und zu Gruppen von 10-20 Individuen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gesammelt. Sie wurden

**Abb: 9:**

Lage und Bezeichnung der Stationen, die für biochemische Untersuchungen bearbeitet wurden.

in flüssigem Stickstoff ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) schockgefroren und bei  $-74\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur späteren Weiterbearbeitung gelagert. Das Kühlen mit Eiswürfeln zum Erreichen niedriger Temperaturen in der Probe sowie die schnelle Verarbeitung des Probenmaterials war erforderlich, um eine enzymatische Zerstörung von Nukleinsäuren durch Zersetzungsprozesse nach dem Tode der Larven zu minimieren (BUCKLEY & BULOW 1987, DORTCH et al. 1983, MUNRO & FLECK 1966 a). Im Rahmen der hier durchgeführten Arbeiten ließ sich zeigen, daß Bearbeitungszeiten an Bord eines Forschungsschiffes von 10-30 min bis zum Überführen in flüssigen Stickstoff keinen

signifikanten Einfluß auf die RNA/DNA Verhältnisse der Larven hatten (Kovarianz-Analyse,  $p < 0.05$ ). Das Aussortieren der Larven aus dem Fang wurde nach 30 min beendet.

### 2.3.2 Auswertung der befischten Stationen

Bei der Klassifizierung des feldbiologischen Materials erfolgte zuerst eine Einteilung in die vier Untersuchungsgebiete: Nördliche Nordsee, Englischer Kanal, Nord-Ostsee-Kanal und Schlei. Bei der Materialsammlung in der nördlichen Nordsee wurde versucht, ein möglichst ausgedehntes Größenspektrum der Heringslarven zu erfassen, um feststellen zu können, ob Hungerzustände speziell bei bestimmten Längen- bzw. Altersgruppen vermehrt auftreten. Bei der Auswertung der Ergebnisse von Heringslarven aus der nördlichen Nordsee erfolgte eine Einteilung in die Fanggebiete: Orkney/Shetland, das Gebiet nördlich von Kap Wrath (schottische Nordwestküste) und das Gebiet der schottischen Nordwestküste. Eine Zusammenfassung der ausgewerteten Stationen mit Angabe der Larvenlängen ist in Tabelle 1 dargestellt. Die Position der Stationen ist aus Abb. 9 ersichtlich.

**Tabelle 1:**

Einteilung des Herings- Feldlarvenmaterials, das auf der Reise des F.S. Poseidon in die nördliche Nordsee gefangen wurde.

Gebiet	Station	Larvenlängen [mm SL]	Auswerte- bezeichnung	Anzahl
zwischen Orkney- und Shetland- Inseln	510	6-8	Stat. 510	27
Schottische Nordwestküste, Gebiet nördlich Kap Wrath	703	11-18	Stat. 703	79
Schottische Nordwestküste	638 666 679 692	6.5-9.5	Stat. Northwest- Schottland	57

Die Probennahme der Heringslarven aus dem Englischen Kanal erfolgte über einen Zeitraum von 24 Stunden auf einer Dauerstation zwischen dem 25.01.86 und 26.01.86. Dadurch konnte untersucht werden, ob Unterschiede in den RNA/DNA Verhältnissen und damit in der Ernährungslage zwischen Tag- und Nachtfängen auftreten.

## **2.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG**

Zur Prüfung von Unterschieden zwischen allen berechneten Mittelwerten wurde der Student's t-Test verwendet. Bei kleinen Stichproben erfolgte der Median - Vergleich mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test (SACHS 1983) unter Verwendung des 95 % Signifikanzniveaus. Zum Vergleich der RNA- und DNA- Gehalte sowie der RNA/DNA Verhältnisse zwischen unterschiedlich behandelten Gruppen wurde die Varianz- Analyse durchgeführt. Sollte der Einfluß weiterer Faktoren, wie z. B. der Länge mit berücksichtigt werden, erfolgte eine Kovarianz- Analyse. Ein Wahrscheinlichkeitsbereich von 0.05 wurde als signifikant bezeichnet.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 ANALYTISCHE METHODEN

##### 3.1.1 Überprüfung der Methodik zur Extraktion, Reinigung und fluorimetrischen Bestimmung von Nukleinsäuren

###### Extraktion und Reinigung

Die Ergebnisse zum Einfluß verschiedener Waschschrte auf die Nukleinsäurereinigung sind Tabelle 2 zu entnehmen.

**Tabelle 2:**

Einfluß verschiedener Waschschrte während der Nukleinsäurereinigungsprozedur auf die Fluoreszenzbestimmungen von DNA und RNA mit Ethidiumbromid am Beispiel von zwei Heringslarvenhomogenaten mit unterschiedlichen Nukleinsäuregehalten.

Reinigungsprozedur		Homogenat 1 [rel. Fluor. %]	Homogenat 2 [rel. Fluor. %]
I.	2x Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol Behandlung		
	1x Chloroform/ Isoamylalkohol Behandlung	65.0	18.5
II.	2x Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol Behandlung		
	2x Chloroform/ Isoamylalkohol Behandlung	93.4	21.9
III.	3x Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol Behandlung		
	1x Chloroform/ Isoamylalkohol Behandlung	62.9	15.0
IV.	3x Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol Behandlung		
	2x Chloroform/ Isoamylalkohol Behandlung	92.0	19.7

Die besten Resultate hinsichtlich Fluoreszenz-Intensität und Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse wurden beim Einsatz von zwei Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol Waschschritten gefolgt von zwei Waschschritten mit Chloroform/ Isoamylalkohol (Reinigungsprozedur II.) erzielt. Ein dritter Waschschriff mit Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (Reinigungsprozedur IV.) hatte keine Erhöhung der Fluoreszenzintensität zur Folge. Es konnte daher angenommen werden, daß zweimaliges Ausschütteln eine ausreichende Reinigung der Extrakte bewirkt.

Zur Überprüfung des Zustandes der gereinigten Nukleinsäuren wurden diese auf Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Abb. 10 zeigt das Ergebnis für 5 Proben von individuellen Heringslarven-Nukleinsäurepräparationen. Alle Proben zeigen hochmolekulare DNA und deutliche Banden für die einzelnen r-RNA- Untereinheiten (23s- & 16s- r-RNA).

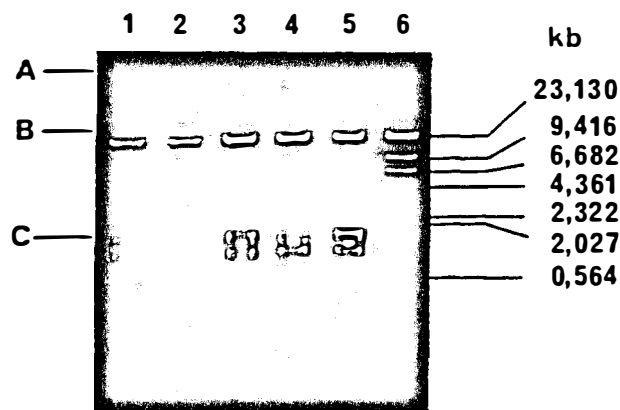


Abb. 10:

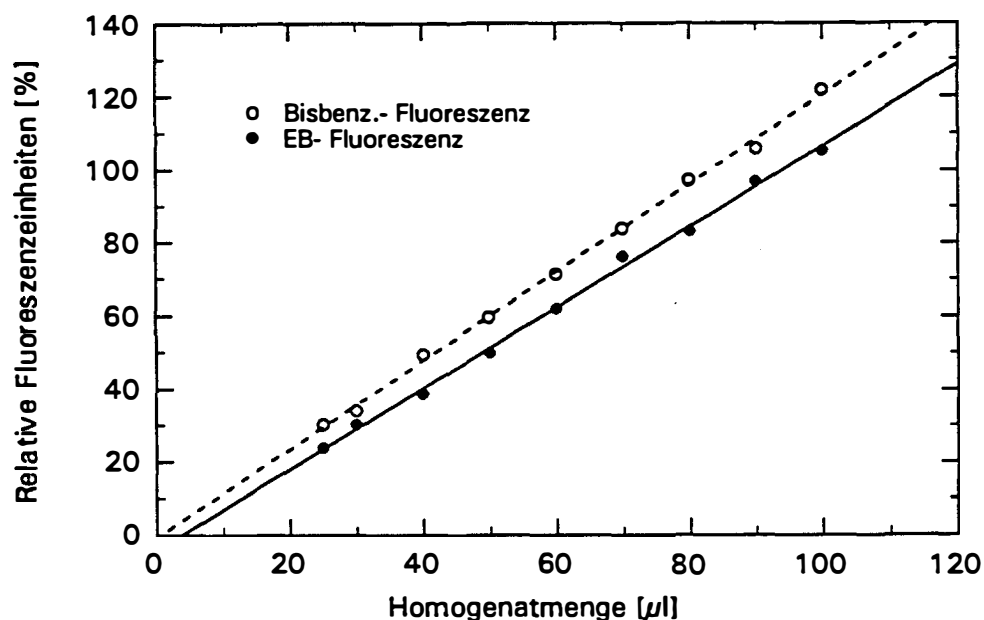
Agarosegel-Elektrophorese von aus Heringslarven extrahierten und gereinigten Nukleinsäuren. Die Elektrophorese wurde in 0.8 % Agarose durchgeführt.

Die Bahnen 1-5 zeigen DNA- Banden (B) und RNA- Banden (C) einzelner Larven. Bahn 6 zeigt den verwendeten Molekulargewichtsstandard (Lambda-DNA geschnitten mit den Restriktionsenzymen Hind III und ACC I). Die Werte für die Molekulargewichte sind in Kilobasen (1kb = 1000 Basen) angegeben. (A) kennzeichnet den Auftragungspunkt der Proben.

## Fluorimetrische Nukleinsäuremessungen

### Eigenfluoreszenz der Proben

Die Eigenfluoreszenz der gereinigten Nukleinsäurelösungen wurde vor der Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes bestimmt. Relativ zum Gesamtfluoreszenzsignal ergaben sich Werte für das Eigenfluoreszenzsignal von 1-4 %, das damit zu vernachlässigen ist.



**Abb. 11:**

Beziehung zwischen Nukleinsäure- Fluoreszenzfarbstoff- Fluoreszenz und der eingesetzten Heringslarvenhomogenatmenge (gereinigte Fischlarvennukleinsäuren). Kurven wurden mittels linearer Regressionsanalyse erstellt.

EB- Fluoreszenz in Abhängigkeit von der eingesetzten Homogenatmenge:

$$y = -4.02 + 1.107 x, r = 0.997$$

(Anregungswellenlänge 365 nm, Emissionswellenlänge 590 nm)

Bisbenzimidazol- Fluoreszenz in Abhängigkeit von der eingesetzten Homogenatmenge:

$$y = -0.651 + 1.212 x, r = 0.998$$

(Anregungswellenlänge 352 nm, Emissionswellenlänge 448 nm)

### Proportionalität

Die Messungen von RNA + DNA mit EB und von DNA mit Bisbenzimidazol zeigten einen linearen Zusammenhang zwischen Nukleinsäuremenge und Fluoreszenzsignal

(Abb. 11). Der Variationskoeffizient lag bei 2.1 % für die DNA- und bei 2.3 % für die RNA- Bestimmung.

Nach LePECQ & PAOLETTI (1966) sollte sich ein Verhältnis zwischen den RNA- und DNA- Fluoreszenzen von 0.46 einstellen. Der in den hier beschriebenen Eichkurven bestimmte Faktor ist mit dem der oben genannten Autoren identisch.

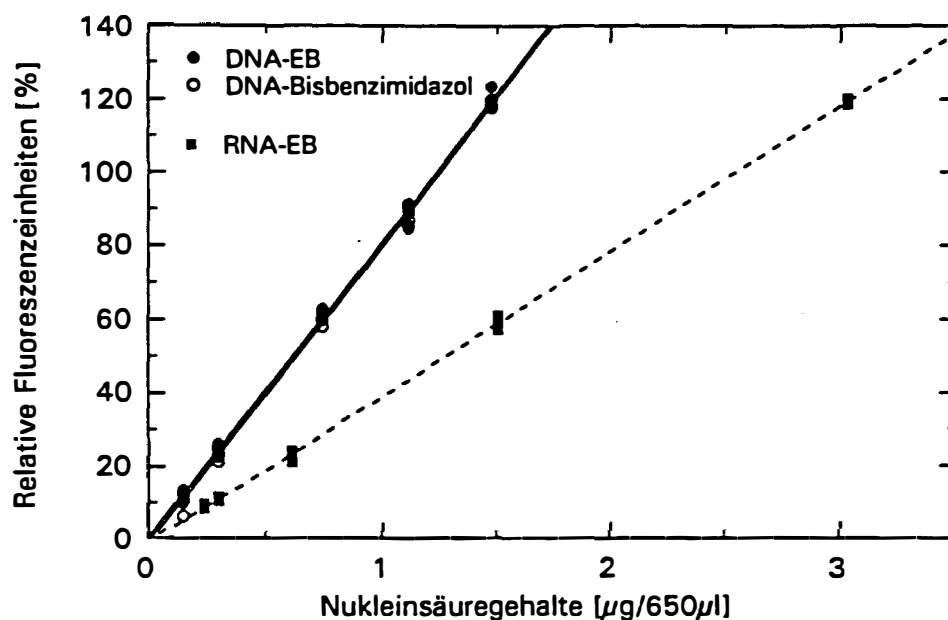


Abb. 12:

DNA-EB, RNA-EB und DNA-Bisbenzimidazol Eichkurven unter Verwendung von Kalbsthymus- DNA und Hefe- RNA. Kurven wurden mittels linearer Regression angepaßt:

- DNA-EB :  $y = 0.453 + 80.587 x$ ,  $r = 0.997$

- RNA-EB :  $y = -0.799 + 39.676 x$ ,  $r = 0.999$

(Anregungswellenlänge 365 nm, Emissionswellenlänge 590 nm)

- DNA-Bisbenzimidazol:  $y = -1.203 + 81.023 x$ ,  $r = 0.998$

(Anregungswellenlänge 352 nm, Emissionswellenlänge 448 nm)

#### Nukleinsäure- Eichkurven

Verschiedene Mengen von Kalbsthymus- DNA und Hefe- RNA wurden mit EB versetzt und fluorimetrisch bestimmt. Abb. 12 zeigt die sich ergebenden Eichkurven. Zusätzlich ist die DNA-Bisbenzimidazol Eichkurve in der Abbildung dargestellt. Die jeweiligen Nukleinsäurekonzentrationen wurden über die aus der linearen Regressionsanalyse ermittelten Geradengleichungen rechnerisch bestimmt. Die unterschiedliche



Steigung der RNA-EB und DNA-EB Eichkurven läßt sich durch die Strukturen der beiden Substanzen erklären. Die deutlich höhere Steigung der DNA-EB Eichkurve kommt durch Interkalation des EB an den Doppelstrangbereichen zustande. Da die RNA nur teilweise Doppelstrangbereiche aufweist, ist die konzentrationsabhängige Fluoreszenzzunahme geringer.

### 3.1.2 Optimierung der Methoden

Bei Verwendung der unter 2.1.2 beschriebenen Methode zur Bestimmung von Nukleinsäuren im Gewebe von Fischlarven, konnten die RNA/DNA Verhältnisse von etwa 20 Larven pro Tag erfaßt werden. Um einen routinemäßigen Einsatz zur Bestimmung des Ernährungszustandes im Rahmen von Fischlarvensurveys zu ermöglichen, war eine Beschleunigung des Analyseverfahrens anzustreben. Veränderungen in zwei Bereichen boten sich an.

1. Ersatz für das zeitintensive "Handhomogenisieren" der Larven und Reduzierung der für die Reinigung der Fischlarvennukleinsäuren nötigen Schritte
2. Änderung der fluoreszenzphotometrischen Meßtechnik

#### zu 1: Ersatz des "Handhomogenisierens"

Als Ersatz für das zeitintensive "Handhomogenisieren" mit einem "Potter Elvehjem" Mikrohomogenisator wurde der Einsatz einer Schwingmühle (Retsch Typ MM-2) zum Homogenisieren von Fischlarvengewebe in kleinem Maßstab angewendet. 10 Proben (Fischlarve + Lysepuffer + Glasperlen  $\phi$  0.2 mm), konnten parallel durch hochfrequentes Schütteln in Eppendorf Reaktionsgefäßen homogenisiert werden.

Um den Einfluß der Reduktion der in 2.1.2 beschriebenen und verwendeten Reinigungsschritte und Behandlungszeiten zu bestimmen, wurden Aliquots eines Fischlarvensammelhomogenates verschiedenen Behandlungen unterzogen. Im Vergleich zu dem ersten Reinigungsverfahren wurden bei dem überarbeiteten zweiten Verfahren die Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol und Chloroform/ Isoamylalkohol Waschschrte nur einmal durchgeführt. Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse dieses Vergleichs der Nukleinsäurereinigungsverfahren. Sowohl für die RNA- Gehalte/Larve als auch für die DNA- Gehalte/Larve ergab die zweite überarbeitete Methode signifikant höhere RNA-

und DNA- Ausbeuten (t-Test,  $p < 0.05$ ). Da die höheren Ausbeuten sowohl bei RNA als auch bei DNA auftraten, wurden keine Unterschiede im resultierenden RNA/DNA Verhältnis beobachtet. Das überarbeitete Aufschlußverfahren ist dem Flußdiagramm in Abb. 14 (Seite 35) zu entnehmen.

**Tabelle 3:**

Vergleich der unterschiedlichen Nukleinsäure- Reinigungs- Verfahren für die RNA- und DNA- Gehaltsbestimmungen an Aliquots eines Heringslarven- Sammelhomogenates. Die fluoreszenzphotometrischen Messungen erfolgten mit Bisbenzimidazol und Ethidiumbromid ( $\bar{x}$  = Mittelwert,  $s_x$  = Standardabweichung,  $V_x$  = Variationskoeffizient in %).

Erste verwendete Methode zur Reinigung von Nukleinsäuren aus Fischlarven			Überarbeitete Methode zur Reinigung von Nukleinsäuren aus Fischlarven		
$\mu\text{g DNA/}$ Larve	$\mu\text{g RNA/}$ Larve	RNA/DNA	$\mu\text{g DNA/}$ Larve	$\mu\text{g RNA/}$ Larve	RNA/DNA
1.72	6.04	3.5	3.13	8.53	2.7
2.08	6.28	3.0	2.70	8.32	3.1
2.12	6.04	2.8	2.97	7.53	2.5
1.88	6.12	3.3	2.60	8.22	3.2
2.24	6.28	2.8	2.54	8.27	3.3
2.92	6.20	2.1	2.81	8.43	3.0
2.12	5.88	2.8	2.92	8.32	2.9
2.04	5.96	2.9	3.07	7.95	2.6
-	-	-	2.92	7.79	2.7
$\bar{x} = 2.14$	$\bar{x} = 6.10$	$\bar{x} = 2.90$	$\bar{x} = 2.85$	$\bar{x} = 8.15$	$\bar{x} = 2.90$
$s_x = 0.35$	$s_x = 0.15$	$s_x = 0.41$	$s_x = 0.20$	$s_x = 0.33$	$s_x = 0.28$
$V_x = 16.50$	$V_x = 2.40$	$V_x = 14.30$	$V_x = 7.20$	$V_x = 4.00$	$V_x = 9.70$

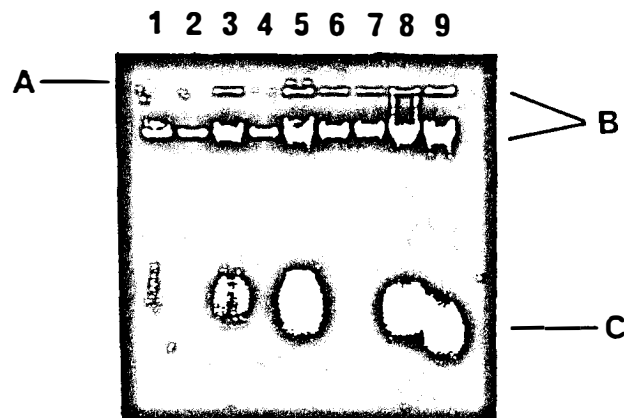
## zu 2: Änderung der fluoreszenzphotometrischen Meßtechnik

Wie unter 2.1.2.2 beschrieben kann die Bestimmung von RNA und DNA mit Ethidiumbromid sowie der Nachweis von DNA mit Ethidiumbromid nach erfolgtem RNA- Abbau durch RNase erfolgen.

Die Nukleinsäuregehalte einer Probe wurden vor der RNase- Behandlung (DNA + RNA), sowie nach der RNase- Behandlung (DNA) mit Ethidiumbromid bestimmt. Aus der Differenz der Messungen ließen sich die DNA- und RNA- Konzentrationen errechnen. Zur Ermittlung der optimalen RNase- Konzentration wurden RNA- und DNA- Standards mit 5 verschiedenen RNase- Konzentrationen (10, 15, 25, 50,

100  $\mu\text{g/ml}$ ) versetzt, 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend fluorimetrisch gemessen. Alle verwendeten RNase- Konzentrationen führten zu einem vollständigen Abbau der RNA bis auf ein Restsignal von etwa 3 %, das auf die Eigenfluoreszenz des Enzyms selbst zurückzuführen war. Die geringste RNase- Konzentration (10  $\mu\text{g/ml}$ ) erwies sich als optimal. Die RNA war vollständig abgebaut, die DNA wurde nicht beeinflusst. Das geänderte fluorimetrische Meßverfahren ist dem Flußdiagramm Abb. 14 zu entnehmen.

Der vollständige Abbau der RNA durch RNase wurde auch mittels Gelelektrophorese überprüft. Gereinigte Nukleinsäurelösungen wurden elektrophoretisch auf Agarose- Gelen getrennt. Bei Proben ohne RNase- Zusatz war die RNA- Bande deutlich zu erkennen. Nach Inkubation mit RNase war die RNA gelelektrophoretisch nicht mehr nachweisbar (Abb. 13).



**Abb. 13:**

Agarosegel- Elektrophorese von Nukleinsäurelösungen, die aus individuellen Heringslarven extrahiert und gereinigt wurden. Die Elektrophorese wurde in 0.8 % Agarose durchgeführt. Bahnen 1,3,5,8 und 9 zeigen die RNA- und DNA- Banden individueller Larven. Die Proben der Bahnen 2,4,6 and 7 wurden mit RNase behandelt. (A) kennzeichnet den Auftragungspunkt der Proben, (B) die DNA Banden und (C) die RNA Banden.

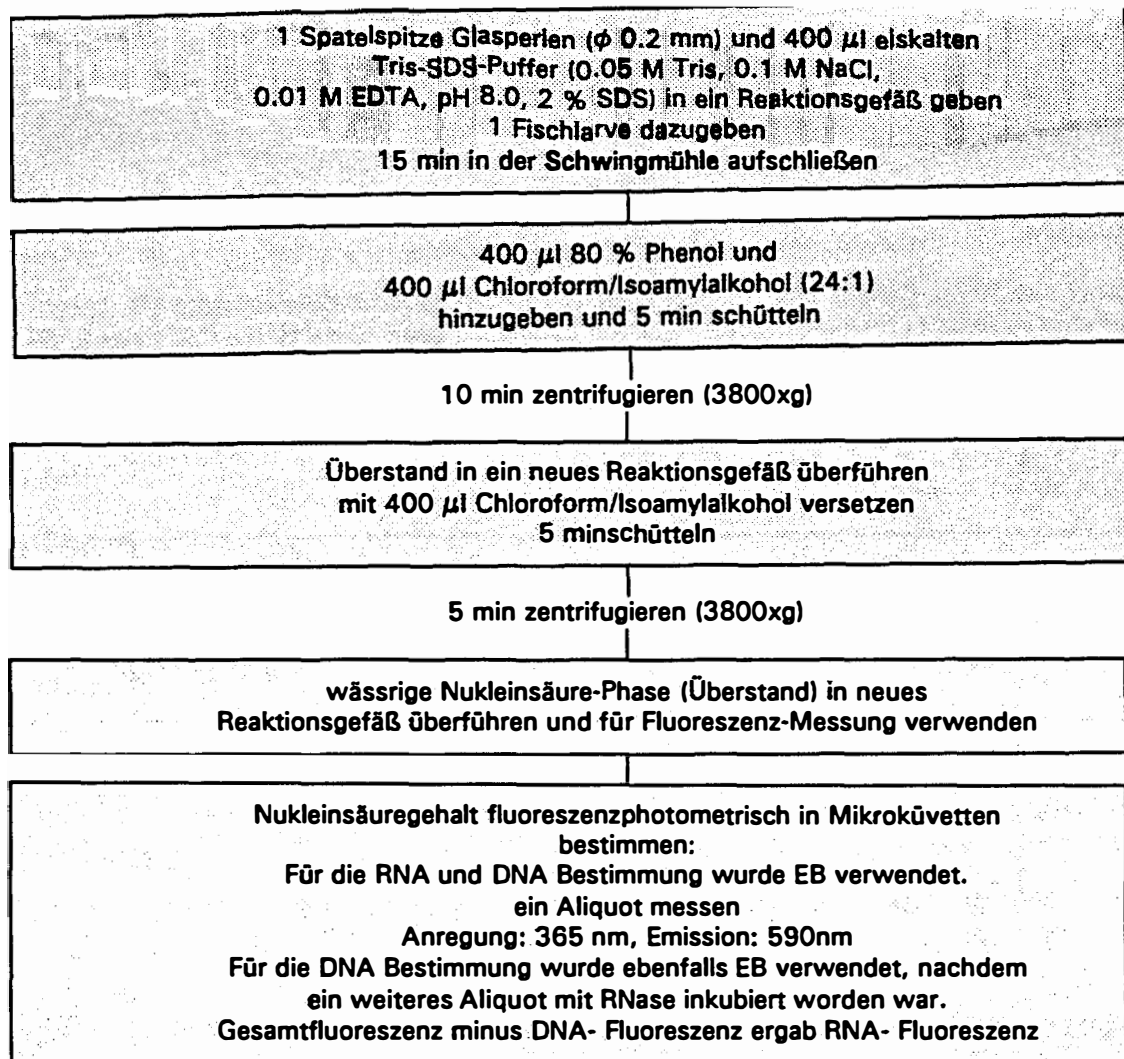


Abb. 14:

Flußdiagramm der überarbeiteten Nukleinsäureaufschluß- Reinigungs- und Meßprozedur

### 3.1.3 Vergleich der eingesetzten fluorimetrischen Nukleinsäurenachweismethoden

Zum Vergleich der beiden beschriebenen Nukleinsäurebestimmungsmethoden wurden Aliquots eines Heringslarven- Sammelhomogenates analysiert (Tabelle 4). Die überarbeitete Methode führte durch Verwendung der Schüttelmühle und Einsatz eines anderen fluorimetrischen Nachweisverfahrens zu deutlich höheren DNA- Gehalten bei etwa vergleichbaren RNA- Gehalten. Damit ergaben sich Unterschiede in den daraus resultierenden RNA/DNA Verhältnissen. Aus dem Vergleich der RNA/DNA Quotienten zwischen beiden Verfahren ergab sich ein mittlerer Faktor von 1.22

(Tabelle 4). Um Meßergebnisse der zweiten Methode mit denen der ersten vergleichen zu können, mußten die RNA/DNA Verhältnisse der zweiten überarbeiteten Methode mit diesem Faktor multipliziert werden.

**Tabelle 4:**

RNA- und DNA- Gehalte von Aliquots eines Heringslarven-Sammelhomogenates (\*) (jeweils auf eine einzelne Larve umgerechnet) und von individuell gemessenen Heringslarven (+), die mit der ersten Methode (Abb. 2) und mit der überarbeiteten zweiten Methode (Abb. 14) bestimmt wurden.

(\*) Mittelwerte aus 11 Parallelbestimmungen

(+) Mittelwerte von 3-11 Parallelbestimmungen

$V_x$  = Variationskoeffizient in %

Erste RNA/DNA Meßtechnik			Zweite überarbeitete RNA/DNA Meßtechnik			Faktor: (A)/(B)
$\mu\text{g DNA}$	$\mu\text{g RNA}$	RNA/DNA (A)	$\mu\text{g DNA}$	$\mu\text{g RNA}$	RNA/DNA (B)	
(*) 3.54 $\pm 0.23$ $V_x = 6.50$	5.48 $\pm 0.41$ $V_x = 7.48$	1.56 $\pm 0.11$ $V_x = 7.05$	4.08 $\pm 0.17$ $V_x = 4.17$	5.42 $\pm 0.39$ $V_x = 7.20$	1.34 $\pm 0.12$ $V_x = 9.00$	1.16
(*) 1.80 $\pm 0.13$ $V_x = 7.22$	2.96 $\pm 0.29$ $V_x = 9.80$	1.58 $\pm 0.15$ $V_x = 9.49$	2.08 $\pm 0.07$ $V_x = 3.37$	2.68 $\pm 0.24$ $V_x = 9.00$	1.28 $\pm 0.13$ $V_x = 10.20$	1.23
(+) 1.57 $\pm 0.07$	5.44 $\pm 0.83$	3.40 $\pm 0.49$	2.60 $\pm 0.31$	6.43 $\pm 0.83$	2.50 $\pm 0.25$	1.36
(+) 1.70 $\pm 0.11$	4.82 $\pm 0.85$	2.80 $\pm 0.36$	2.54 $\pm 0.17$	6.28 $\pm 0.68$	2.50 $\pm 0.22$	1.12
Mittelwert: 1.22 Standardabweichung: $\pm 0.11$						

### 3.1.4 Ausbeutebestimmung im Präparationsgang

Um Verluste von Nukleinsäuren im Präparationsgang quantifizieren zu können, wurden definierte Mengen des DNA- und RNA- Standards, der auch für die Erstellung der Eichkurven (s.o.) verwendet wurde, 24 Fischlarvenhomogenaten vor Beginn des Aufschlusses beigelegt ("spike"). Durch die Zugabe der Standard-Nukleinsäuren zum

Fischlarvengewebe liegen diese geschützt in einer biologischen Matrix und ermöglichen eine gute Abschätzung der Einwirkungen des Extraktionsganges auf die Fischlarven-nukleinsäuren. Parallel dazu wurden Fischlarvenhomogenate ohne RNA- und DNA-Zusatz und auch reine RNA- und DNA- Standards der Aufschluß- und Reinigungs-prozedur unterzogen.

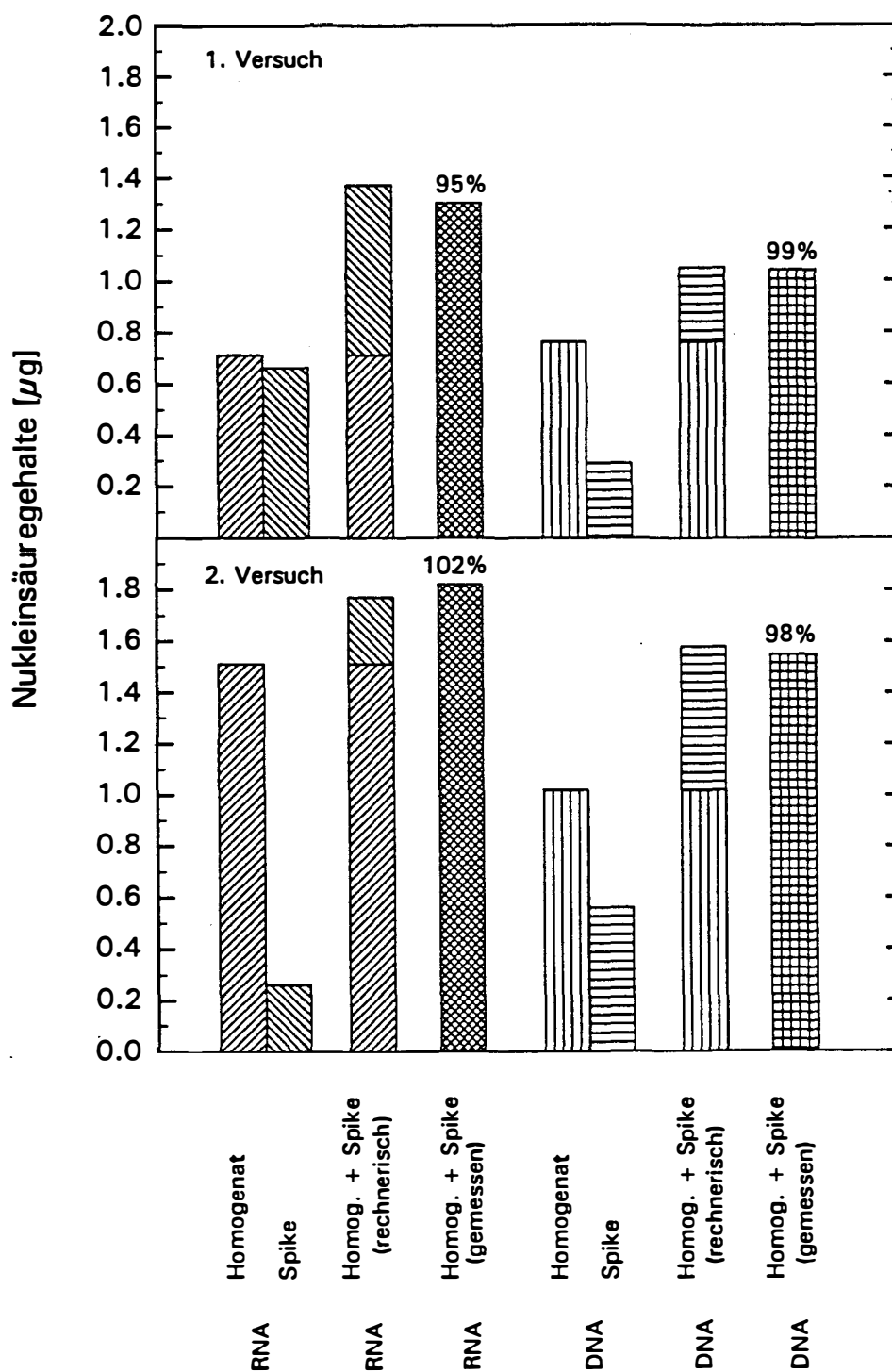
Aus der Differenz zwischen mittlerem Nukleinsäuregehalt von reinem Larven-homogenat und mit Nukleinsäurestandard (= "spike") versetztem Larvenhomogenat im Vergleich zur Standard- Nukleinsäureprobe wurde der Verlust an Nukleinsäurestandard bestimmt. Unter der Annahme, daß sich die Fischlarvennukleinsäuren während des Aufschlusses wie der zugefügte Standard verhalten, wurden Verluste, die beim Standard im Fischlarvenhomogenat auftraten, auf die Nukleinsäuren der Fischlarven übertragen. Die Wiederfindungsraten lagen für DNA bei 98 % bzw. 99 %. Für die RNA wurden Wiederfindungsraten von 90.2 % bzw. 95 % ermittelt (Abb. 15).

## **3.2 RNA- UND DNA- GEHALTSBESTIMMUNGEN VON HERINGS- UND STEINBUTTLARVEN AUS LABORAUFZUCHTEN**

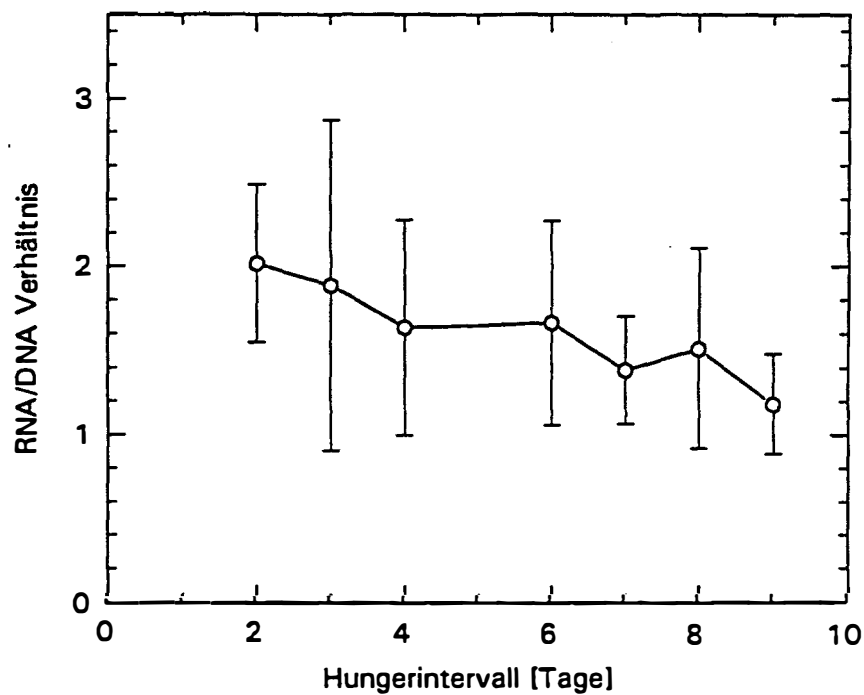
### **3.2.1 Einfluß des Hungerintervalls auf das RNA/DNA Verhältnis**

Die Bestimmung der RNA- und DNA- Gehalte von individuellen Heringslarven erfolgte nach der unter 2.1.2 beschriebenen zuerst erarbeiteten Methode mit Bisbenzimidazol und Ethidiumbromid an Larven der Aufzucht 1986. Zur Kalibrierung der überarbeiteten zweiten Methode (siehe 3.1.2) erfolgte eine Steinbuttlarvenaufzucht im Sommer 1986 sowie eine weitere Heringslarvenaufzucht im Frühjahr 1989.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zur Reaktion des RNA/DNA Verhältnisses auf Hungerintervalle von 2-9 Tagen aller untersuchten Heringslarven im Alter von 9-65 Tagen (Aufzucht 1989) ist in Abb. 16 dargestellt. Mit zunehmendem Hungerintervall nahmen die RNA/DNA Verhältnisse linear ab und erreichten nach 9 Hungertagen ein mittleres RNA/DNA Verhältnis von 1.2. Der Mittelwert für 6-9 Tage hungernde Heringslarven aller Altersgruppen lag bei  $1.42 \pm 0.40$ .

**Abb. 15:**

Bestimmung der Wiederfindungsraten: Dargestellt sind die RNA- und DNA- Gehalte aus Heringslarvensammelhomogenaten aus zwei Versuchsreihen. Die dem jeweiligen Versuch zugefügte Nukleinsäurestandardmenge ist mit "spike" gekennzeichnet. Gezeigt ist die durch Addition von Homogenat und "spike" errechnete Nukleinsäuremenge und die sich aus der Fluoreszenzmessung bestimmte Nukleinsäuremenge. Die angegebenen Prozentwerte ergeben sich aus dem Vergleich der fluorimetrisch bestimmten Nukleinsäure plus "spike" Messung im Vergleich zur rechnerisch zu erwarteten Nukleinsäuremenge.

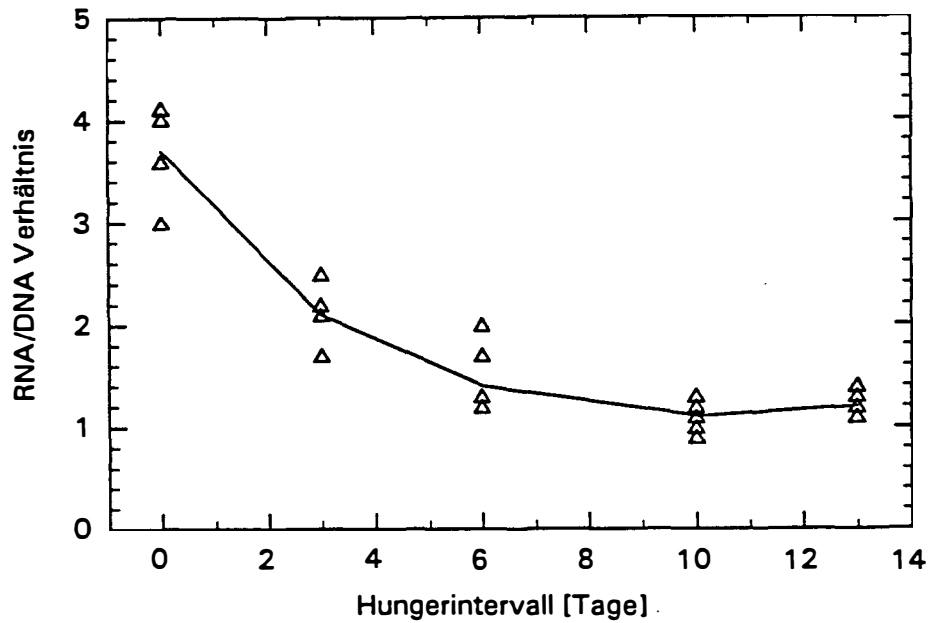
**Abb. 16:**

Beziehung zwischen RNA/DNA Verhältnis und Länge des Hungerintervalls. Dargestellt sind mittlere RNA/DNA Werte und die jeweiligen Standardabweichungen (Heringslarvenaufzucht 1989).

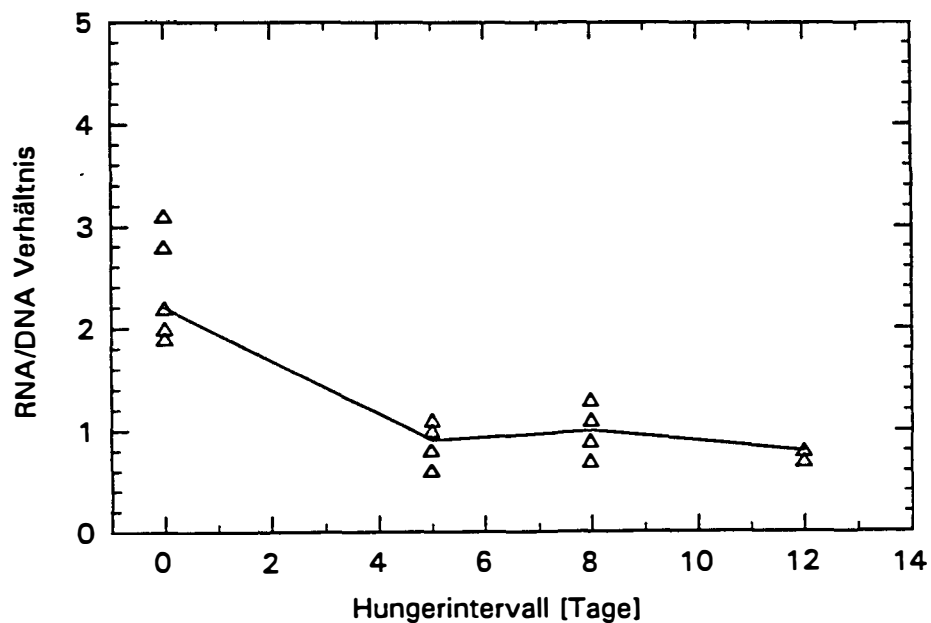
Längere Hungerzeiträume (bis zu 13 Tagen) wurden an älteren Larven, die über ein größeres Hungerpotential verfügen (BLAXTER 1981), untersucht. Dazu wurden die RNA/DNA Verhältnisse von lebend gefangenen, 17-25 mm (SL) langen Heringslarven aus der Schlei sofort nach dem Fang und nach 3, 6, 10 und 13 Hungertagen im Labor analysiert (Abb. 17). Mit zunehmendem Hungerintervall kam es zu einer deutlichen Reduktion in der Höhe der RNA/DNA Quotienten, die sich nach 10-13 Hungertagen asymptotisch auf etwa 1.1 einstellten. Die Varianz zwischen den RNA/DNA Verhältnissen wurde mit zunehmendem Hungerintervall kleiner.

Auch in einem weiteren Hungerversuch mit lebend gefangenen Schlei- Heringslarven über einen Zeitraum von 12 Tagen zeigte sich eine signifikante Abnahme des RNA/DNA Verhältnisses mit der Länge des Hungerintervalls mit einem asymptotischen Kurvenverlauf und einem Grenzwert von etwa 1.1 (Abb. 18).



**Abb. 17:**

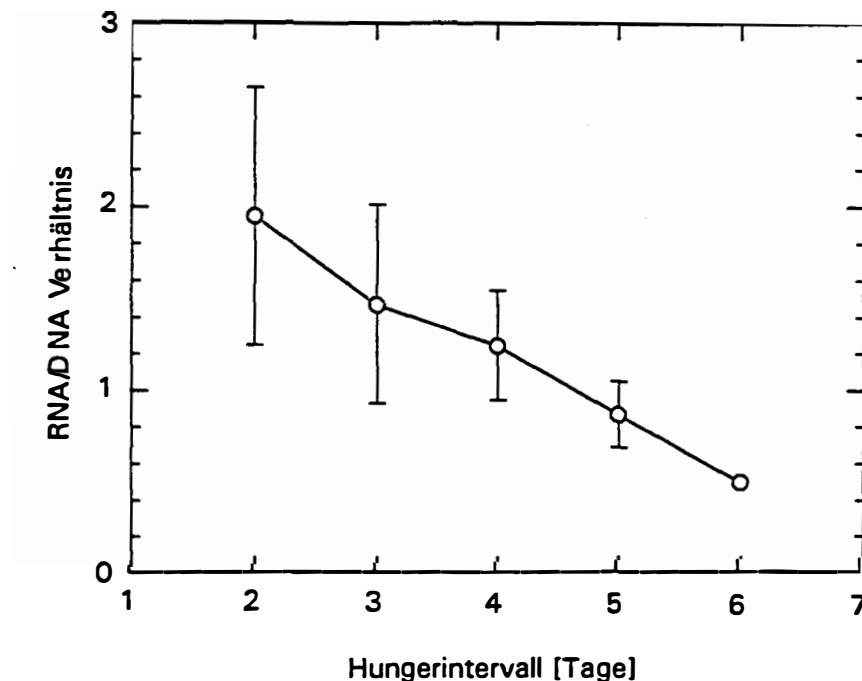
Beziehung zwischen RNA/DNA Verhältnis und Länge des Hungerintervalls der Schleierlingslarven des ersten Hungerversuchs. Dargestellt sind die individuellen Werte (n=31). Die RNA/DNA Verhältnisse am Tage "0" entsprechen den Werten der Larven vom Fangtag. Die eingezeichnete Linie verbindet die Mittelwerte.

**Abb. 18:**

Beziehung zwischen RNA/DNA Verhältnis und Länge des Hungerintervalls der Schleierlingslarven des zweiten Hungerversuchs. Dargestellt sind die individuellen Werte (n=22). Die RNA/DNA Verhältnisse am Tage "0" entsprechen den Werten der Larven vom Fangtag. Die eingezeichnete Linie verbindet die Mittelwerte.

### Steinbutt

Auch bei 10-27 Tage alten Steinbuttlarven führten Hungerintervalle von 2-6 Tagen zu einer deutlichen linearen Abnahme der RNA/DNA Verhältnisse (Abb. 19). Die Varianz zwischen den RNA/DNA Verhältnissen nahm mit zunehmendem Hungerintervall ab.



**Abb. 19:**

Beziehung zwischen RNA/DNA Verhältnis und Länge des Hungerintervalls. Dargestellt sind mittlere RNA/DNA Werte und die jeweiligen Standardabweichungen (Steinbuttlarvenaufzucht 1986).

### 3.2.2 RNA/DNA Verhältnisse in Abhängigkeit vom Larvenalter

#### Hering

Den Vergleich der RNA/DNA Quotienten von gefütterten und hungernden Heringslarven der Aufzucht 1986 zeigt Abb. 20. Bei allen Gruppen hungernder Larven ließen sich geringere RNA/DNA Verhältnisse im Vergleich zu gefütterten Larven feststellen. Mit zunehmendem Hungerintervall verringerten sie sich noch weiter. Eine signifikante Trennung zwischen Futter- und Hungergruppe anhand der RNA/DNA war nach etwa 4 Tagen Hunger ab einem Larvenalter von 9 Tagen nach dem Schlupf möglich. Vorher wiesen auch die gefütterten Larven RNA/DNA Verhältnisse im Bereich der Werte von

hungernden Larven auf, so daß eine Unterscheidung nicht möglich war. Entgegen den Erwartungen zeigte sich eine Zunahme der RNA/DNA Verhältnisse mit dem Alter der Larven.

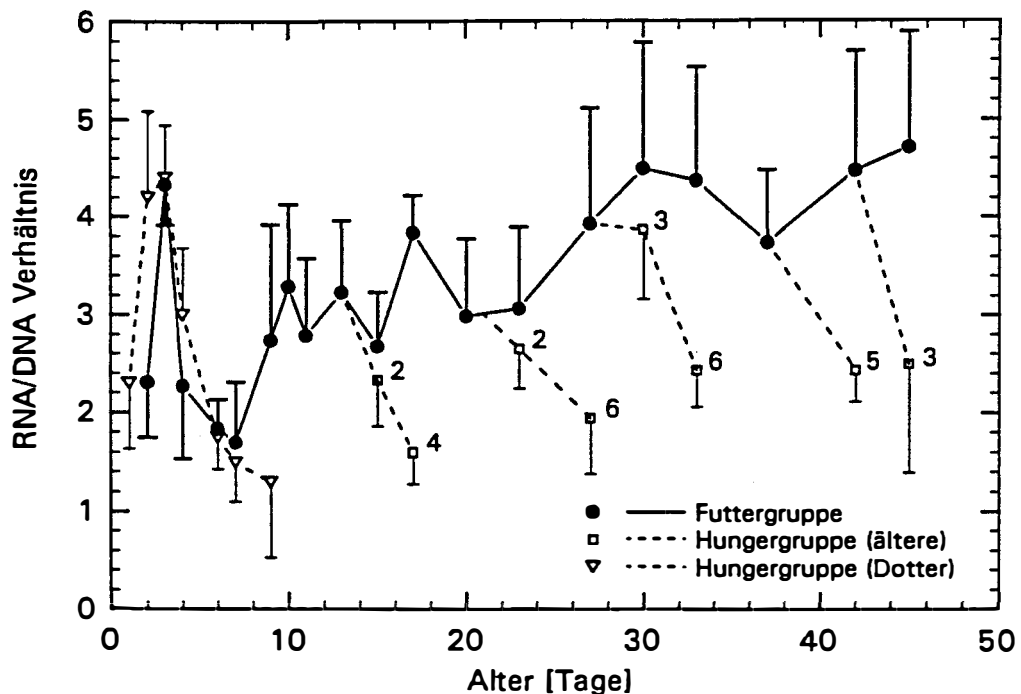


Abb. 20:

Verlauf der RNA/DNA Verhältnisse (Mittelwerte von 5-13 individuellen Bestimmungen) der Futtergruppe im Vergleich zu den Hungergruppen. Die Quadrate kennzeichnen die gefütterten Larven, die anschließend einer Hungerperiode ausgesetzt wurden. Die Dreiecke entsprechen hungernden Dottersacklarven. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist die einseitige Standardabweichung dargestellt (Heringslarvenaufzucht 1986).

RNA/DNA Verhältnisse von 9-65 Tage alten gefütterten Heringslarven und Larven, die zwischen 2 und 9 Tagen gehungert hatten (Aufzucht 1989), zeigt Abb. 21. Im Vergleich zu den Ergebnissen der Aufzucht 1986 lagen diese Werte insgesamt erwartungsgemäß niedriger, da sie mit der zweiten Analyse-methode gemessen wurden, die im Vergleich zur überarbeiteten Nukleinsäureanalyse-Methode um den Faktor 1.22 geringere Quotienten ergab. Bei allen Hungergruppen ließ sich eine signifikante Abnahme des RNA/DNA Verhältnisses im Vergleich zur Futtergruppe unabhängig vom Larvenalter feststellen (Varianz-Analyse,  $p < 0.05$ ). Bereits nach 3-4 Tagen

Futterentzug war eine eindeutige Trennung in Futter- und Hungergruppen möglich. Mit zunehmendem Hungerintervall zeigte sich eine weitere Verringerung des RNA/DNA Quotienten, der bereits nach 6-7 Tagen Futterentzug auf die Hälfte reduziert war. Eine Verlängerung des Hungerintervalls von "3-4 Tage-" auf "6-9 Tage Hunger" führte außerdem zu einer Verringerung der Streuung der RNA/DNA Verhältnisse. Auch hier ließ sich eine leichte Zunahme der RNA/DNA Verhältnisse der Futtergruppe mit dem Alter der Larven zeigen.

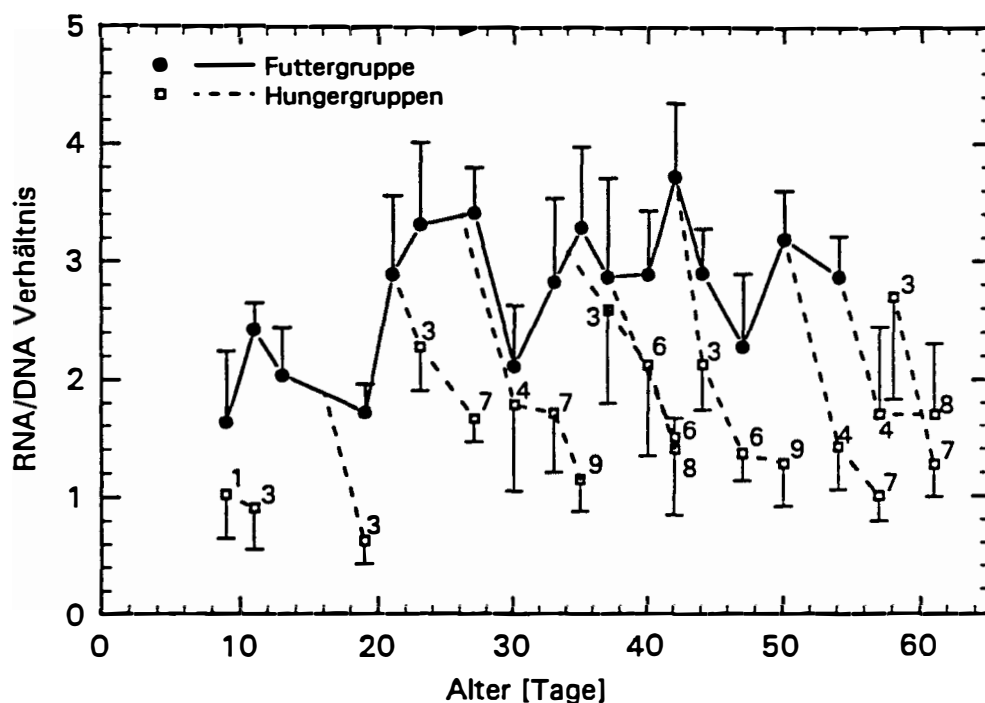
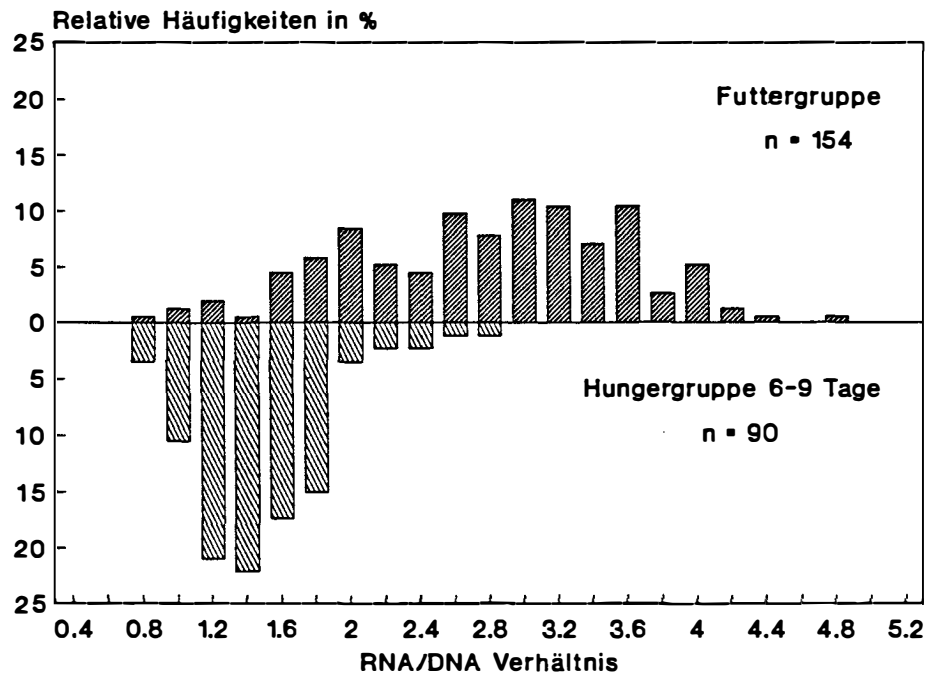


Abb. 21:

Verlauf der RNA/DNA Verhältnisse bei der Futtergruppe im Vergleich zu den Hungergruppen in Abhängigkeit vom Larvenalter (Mittelwerte von 5-15 individuellen Bestimmungen). Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur die einseitige Standardabweichung dargestellt. Ziffern geben die Zahl der Hungertage an (Heringslarvenaufzucht 1989).

Einen Vergleich der RNA/DNA Verhältnisse in Form von relativen Häufigkeitsverteilungen gefütterter und 6-9 Tage hungernder Larven aller untersuchten Altersgruppen zeigt Abb. 22. Die Verteilungen beider Gruppen unterschieden sich signifikant (U-Test,  $p < 0.05$ ). Der Median der RNA/DNA Verhältnisse der Hungergruppe (6-9 Tage Hunger) lag bei 1.4, der der Futtergruppe bei 2.8. Es kam jedoch zu Überschneidungen zwischen den Gruppen. Dabei zeigten sowohl Larven der Futtergruppe geringe RNA/DNA Verhältnisse, typisch für die Hungergruppe, als auch

Larven der Hungergruppe hohe RNA/DNA Quotienten, die eigentlich eine Zuordnung zur Futtergruppe ergeben würden.



**Abb. 22:**

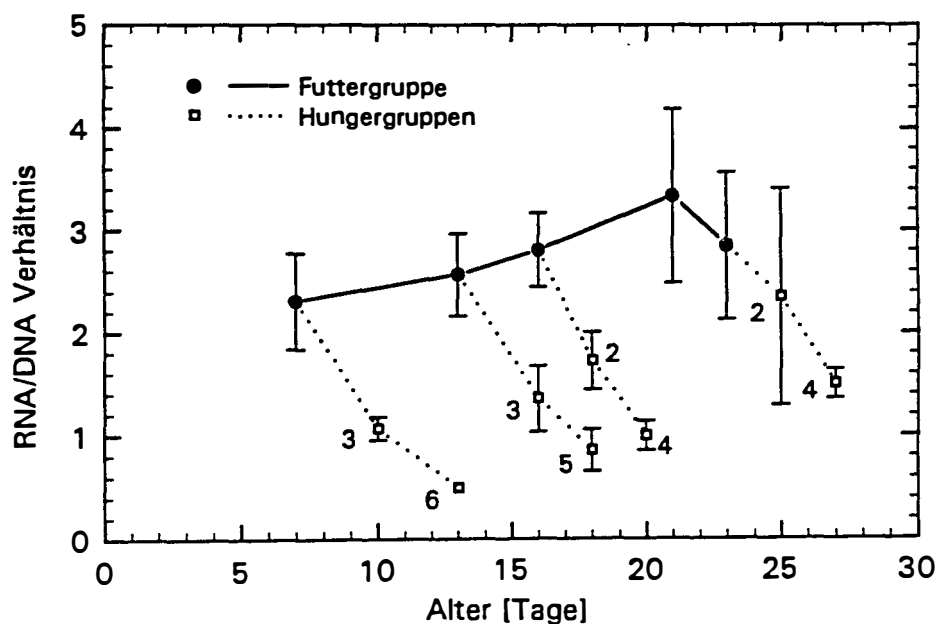
Relative Häufigkeitsverteilungen der RNA/DNA Verhältnisse von Larven, die bei hoher Futterdichte gehalten wurden, im Vergleich zu denen der 6-9 Tage hungernden Larven. Die RNA/DNA- Intervalle sind in Bereiche von 0.2 eingeteilt (Heringslarvenaufzucht 1989).

### Steinbutt

Den Verlauf der RNA/DNA Quotienten von gefütterten und hungernden Steinbuttlarven im Alter von 7 bis zu 27 Tagen zeigt Abb. 23. Die RNA/DNA Verhältnisse der hungernden Larven waren im Vergleich zu den gefütterten Larven in allen Altersgruppen niedriger und nahmen mit zunehmendem Hungerintervall weiter ab. Schon 2-3 Tage Futterentzug bewirkten eine signifikante Trennung zwischen Futter- und Hungergruppe (Kovarianz- Analyse,  $p < 0.05$ ). Sowohl bei den gefütterten als auch bei den hungernden Steinbuttlarven ergab sich ein Trend zu höheren RNA/DNA Verhältnissen mit zunehmendem Larvenalter. Bis zu einem Alter von 20 Tagen ließ sich eine lineare Zunahme der RNA/DNA Verhältnisse der

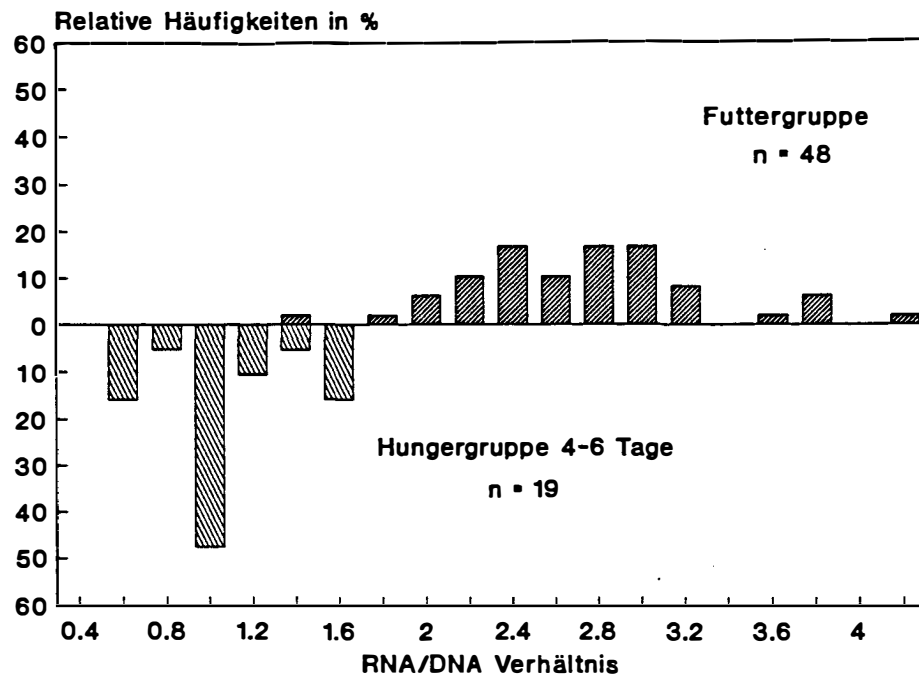
Futtergruppe beobachten. Danach zeigte sich eine deutliche Abnahme des RNA/DNA Quotienten.

Die relativen Häufigkeitsverteilungen der RNA/DNA Verhältnisse von gefütterten und hungernden Steinbuttlarven aller Altersgruppen sind in Abb. 24 dargestellt. Beide Gruppen waren durch die unterschiedliche Verteilung der RNA/DNA Verhältnisse signifikant voneinander trennbar (U-Test,  $p < 0.05$ ). Der Median der RNA/DNA Verteilung hungernder Steinbuttlarven (4-6 Hungertage) lag bei 1.0 im Vergleich zu 2.7 für gefütterte Larven. Es ließen sich fast keine Überschneidungen zwischen den beiden Versuchsgruppen feststellen.



**Abb. 23:**

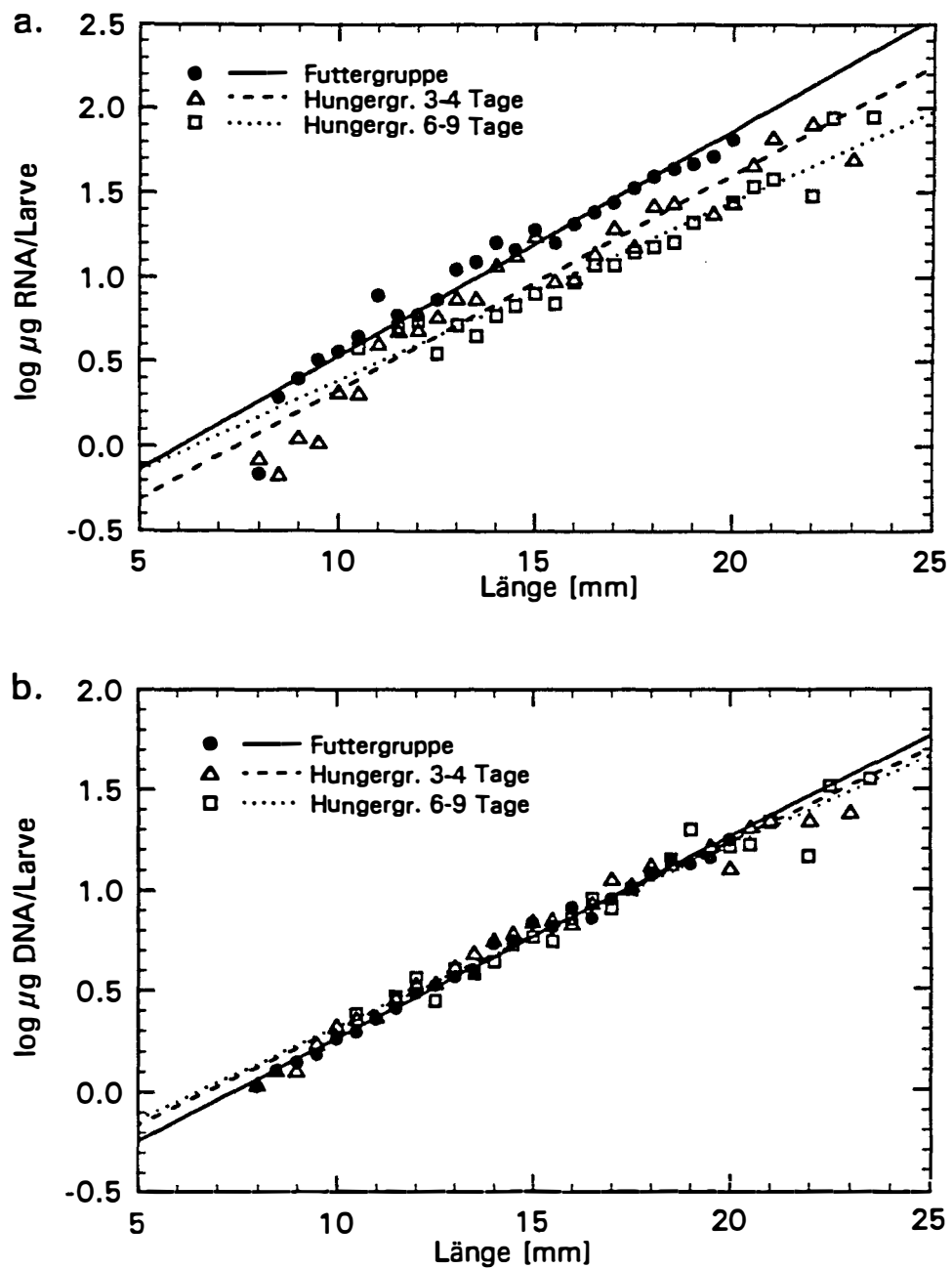
Verlauf der RNA/DNA Verhältnisse bei der Futter- und Hungergruppe in Abhängigkeit vom Larvenalter (Mittelwerte von 5-15 individuellen Bestimmungen). Dargestellt ist die zweiseitige Standardabweichung. Ziffern geben die Zahl der Hungertage an (Steinbuttlarvenaufzucht 1986).

**Abb. 24:**

Relative Häufigkeitsverteilung der RNA/DNA Verhältnisse von Larven, die bei hoher Futterdichte gehältert wurden, im Vergleich zu denen der 4-6 Tage hungernden Larven. Die RNA/DNA- Intervalle sind in Bereiche von 0.2 eingeteilt (Steinbuttlarvenaufzucht 1986).

### 3.2.3 RNA/DNA Verhältnisse in Abhängigkeit von der Larvenlänge

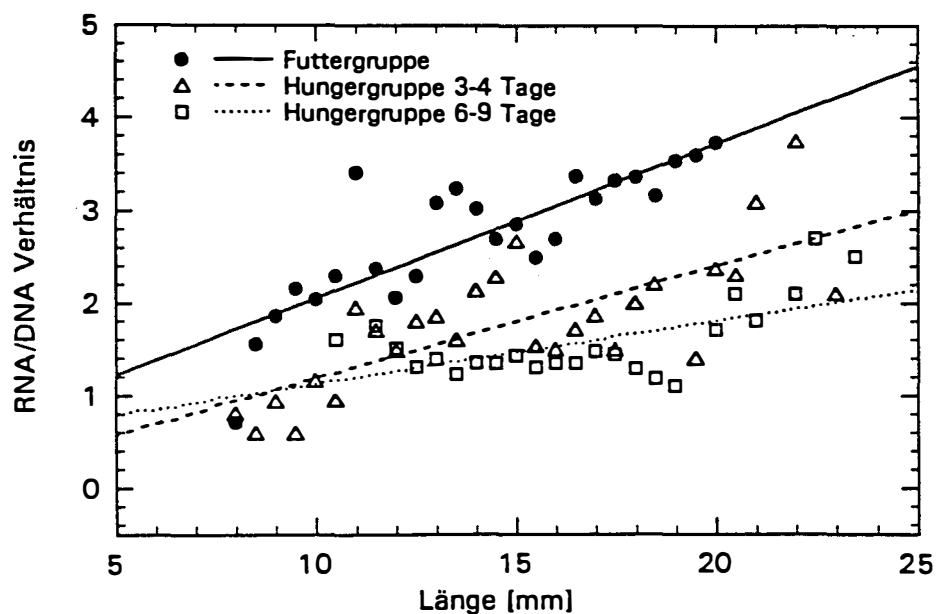
Zur Überprüfung der Zusammenhänge zwischen RNA- und DNA- Gehalt und der Länge wurden gefütterte und hungernde Larven der Gruppen "3-4 Tage Hunger" und "6-9 Tage Hunger" untersucht (Abb. 25 a & b). Die Zunahme des DNA- Gehaltes mit der Larvenlänge war bei allen Untersuchungsgruppen nahezu gleich und erlaubte keine Unterscheidung (Kovarianz- Analyse,  $p < 0.05$ ), da der DNA- Gehalt erwartungsgemäß nicht auf Änderungen im Ernährungszustand reagierte (Abb. 25 b). Die RNA- Gehalte nahmen ebenfalls mit der Länge der Larven zu, sie zeigten jedoch Unterschiede zwischen den drei Ernährungsgruppen. Gefütterte Larven zeigten signifikant höhere RNA- Gehalte als hungernde Larven (Kovarianz- Analyse,  $p < 0.05$ ). Eine Verlängerung des Hungerintervalls von 3-4 auf 6-9 Tage führte dabei zu einer noch deutlicheren Unterscheidung zwischen Futter- und Hungergruppe, da der RNA- Gehalt noch weiter abnahm (Abb. 25 a). Folglich war der RNA- Gehalt für die Beurteilung der Ernährungslage geeignet.

**Abb. 25:**

Zunahme des RNA- Gehaltes pro Larve (a) und des DNA- Gehaltes pro Larve (b) mit der Länge in Abhängigkeit vom Ernährungszustand. Dargestellt sind die mittleren Nukleinsäure-Gehalte von gefütterten, 3-4 Tage hungernden und 6-9 Tage hungernden Individuen. Die eingezeichneten Linien entsprechen den jeweiligen Regressionsgeraden (Heringslarvenaufzucht 1989).



Auch die RNA/DNA Verhältnisse bezogen auf die Larvenlänge erlaubten eine deutliche Trennung der Futtergruppe von den beiden Hungergruppen (Abb. 26). Die Larven der Hungergruppen wiesen im Vergleich zur Futtergruppe bei gleicher Länge geringere RNA/DNA Verhältnisse auf. Entgegen den Erwartungen konnte eine Zunahme der RNA/DNA Quotienten mit dem Alter und der Länge der Larven gezeigt werden. Basierend auf den theoretischen Überlegungen war davon ausgegangen worden, daß das RNA/DNA Verhältnis alters- und damit längenunabhängig zur Zustandsbegutachtung verwendet werden kann, da durch die Betrachtung des längenabhängigen aber ernährungsunabhängigen DNA- Gehaltes die Larvenlänge automatisch mit betrachtet wird. Die größte längenabhängige Zunahme des RNA/DNA Verhältnisses zeigte sich bei der Futtergruppe. Sie wurde mit zunehmendem Hungerintervall signifikant geringer (Abb. 26). Im Vergleich zum Alter als Bezugsgröße führte die Betrachtung der RNA/DNA Verhältnisse in Abhängigkeit von der Larvenlänge zu einer Reduzierung der Streuung zwischen den RNA/DNA Verhältnissen, da durch das Einbeziehen der Larvenlänge das Auseinanderwachsen der Larven einer jeweiligen Altersklasse kompensiert werden kann.



**Abb. 26:**

Mittlere RNA/DNA Verhältnisse bezogen auf die Larvenlänge in Abhängigkeit vom Ernährungszustand. Dargestellt sind Ergebnisse der Futtergruppe, der "3-4 Tage Hunger"- und der "6-9 Tage Hungergruppe". Die eingezeichneten Linien entsprechen den errechneten Regressionsgeraden (Heringslarvenaufzucht 1989).

Um die Längenabhängigkeit des RNA/DNA Verhältnisses und die durch die individuellen Unterschiede bei den Larven bedingte Streuung der RNA/DNA Verhältnisse zu erfassen, wurden die in den jeweiligen Längengruppen ermittelten RNA/DNA Verhältnisse der drei Versuchsgruppen ("Futtergruppe", "3-4 Tage Hunger", "6-9 Tage Hunger") individuell dargestellt und die Regressionsgeraden angepaßt. Zusätzlich ist zur Einbeziehung der individuellen Streuung der RNA/DNA Verhältnisse der Larven der Bereich der einfachen (1s) und der zweifachen Standardabweichung (2s) der angegebenen Regressionsbeziehung dargestellt. Der Streubereich der RNA/DNA Verhältnisse der Larven wird zu 68% durch die einfache Standardabweichung (1s) und zu 95% durch die zweifache Standardabweichung (2s) erfaßt, so daß auch Larven mit RNA/DNA Verhältnissen oberhalb des Mittelwertes hungernder Larven als hungernd erfaßt werden konnten. Bei der Festlegung von RNA/DNA- Grenzwerten, unterhalb derer die Larven als hungernd definiert werden sollen, ist die Erweiterung des Mittelwertes um den Bereich der einfachen oder zweifachen Standardabweichung davon abhängig zu machen, ob die Hungerzuordnung eng oder weit gefaßt werden soll. Je größer der Streubereich nach oben zu höheren RNA/DNA Quotienten erweitert wird, desto höher ist der Anteil von Larven, die als hungernd eingestuft werden. Die Zusammenhänge zwischen individuell bestimmten RNA/DNA Verhältnissen von 3-4 Tage hungernden Heringslarven der Längen 8-23 mm zeigt Abb. 27. Auf der Grundlage der an die Daten angepaßten Regressionsbeziehung ergab sich ein mittleres RNA/DNA Verhältnis von 1.3 für 3-4 Tage hungernde 10 mm große Larven im Vergleich zu 2.6 für 20 mm große Larven. Für Larven der Gruppe "6-9 Tage Hunger" ergab sich die in Abb. 28 dargestellte Beziehung zwischen RNA/DNA Verhältnis und Larvenlänge. Die Zunahme der RNA/DNA Verhältnisse mit der Larvenlänge ist hier nicht so stark ausgeprägt, wie bei der "3-4 Tage Hungergruppe". So zeigten 10 mm große 6-9 Tage hungernde Larven ein mittleres RNA/DNA Verhältnis von 1.2 im Vergleich zu 1.6 bei 20 mm großen Larven. Auch der Wert für die einfache Standardabweichung dieser Beziehung lag deutlich unter dem Wert der 3-4 Tage hungernden Larven. Der Bereich zwischen oberer und unterer Standardabweichung der RNA/DNA Verhältnisse hungernder Larven wird im weiteren Verlauf der Arbeit als "Hungerband" bezeichnet (Abb. 27 & 28), wobei für die Festlegung der Grenzwerte unterhalb derer die Larven als hungernd zu bezeichnen sind, nur der obere 1s- bzw. 2s-Bereich entscheidend ist. Der Vergleich der Ergebnisse der beiden "Hungerbänder" ("3-4 Tage" bzw. "6-9 Tage") zeigte eine deutlich geringere Längenabhängigkeit und eine Reduktion der Streuung innerhalb der individuellen RNA/DNA Bestimmungen für die "6-9 Tage Hungergruppe". Larven, deren RNA/DNA Verhältnisse sich in

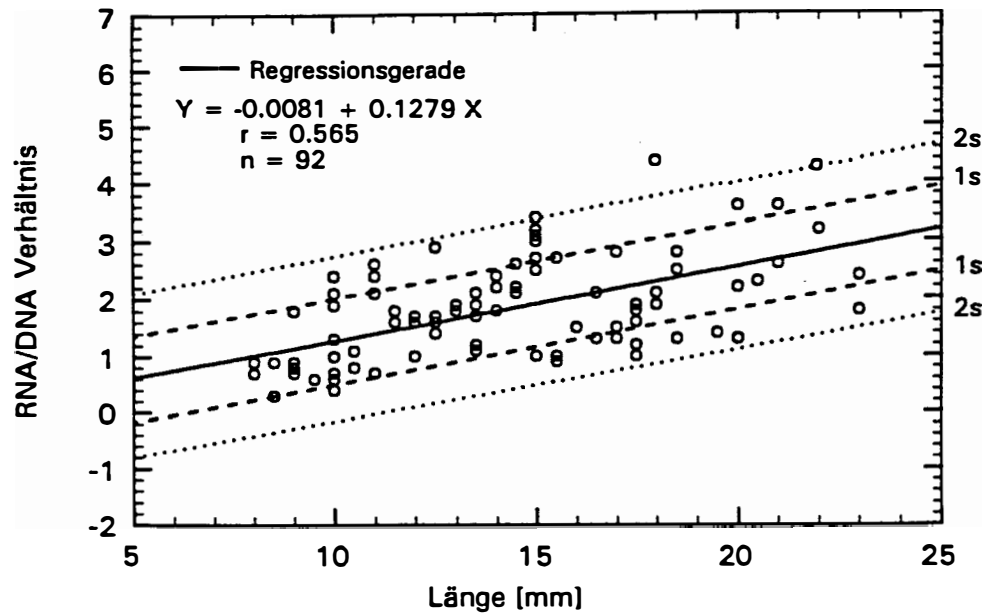


Abb. 27:

RNA/DNA Verhältnisse in Abhängigkeit von der Länge von 3-4 Tage hungernden Larven (individuelle Werte). Die mittlere Linie wurde mittels linearer Regressionsanalyse erstellt. Um die Streuung dieser Regression im Bereich der einfachen Standardabweichung (1s) und der zweifachen Standardabweichung (2s) zu erfassen sind diese zweiseitig dargestellt (Heringslarvenaufzucht 1989).

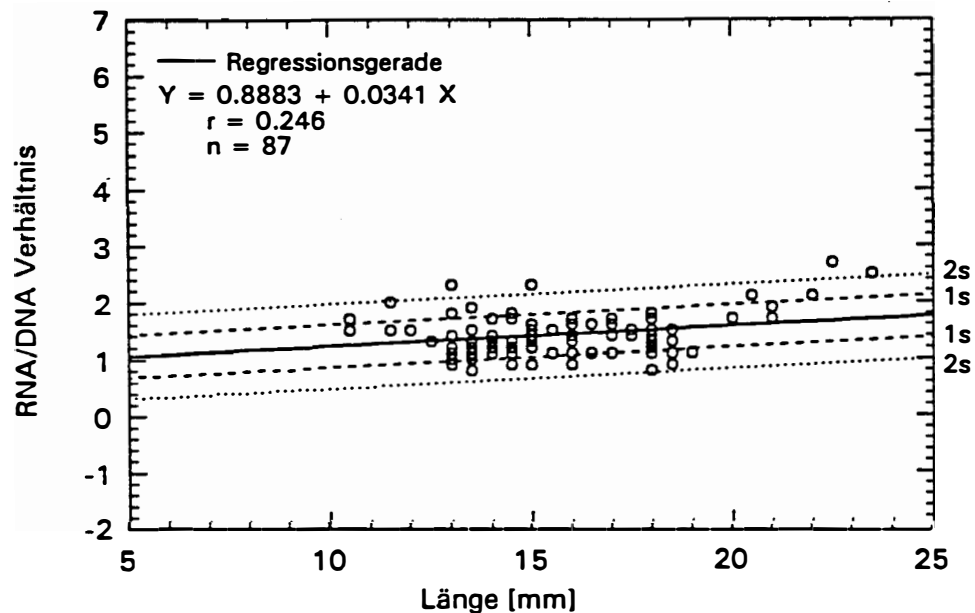


Abb. 28:

RNA/DNA Verhältnisse in Abhängigkeit von der Länge von 6-9 Tage hungernden Larven (individuelle Werte). Die mittlere Linie wurde mittels linearer Regressionsanalyse erstellt. Um die Streuung dieser Regression im Bereich der einfachen Standardabweichung (1s) und der zweifachen Standardabweichung (2s) zu erfassen sind diese zweiseitig dargestellt (Heringslarvenaufzucht 1989).

Abhängigkeit von der Länge im Bereich der Bandbreite der RNA/DNA Verhältnisse von 6-9 Tage hungernden Larven (mittleres RNA/DNA Verhältnis plus zweifache Standardabweichung) befanden, wurden als hungernd definiert. Larven oberhalb dieses Bereiches wurden als nicht hungernd eingestuft.

Die Beziehung zwischen RNA/DNA Verhältnis und der Länge der individuell untersuchten gefütterten Heringslarven ist in Abb. 29 dargestellt. Neben der an die Daten angepaßten linearen Regressionsbeziehung ist auch hier der Bereich der einfachen und zweifachen Standardabweichung als Maß für die beobachtete Streuung der RNA/DNA Verhältnisse angegeben. Diese in Abb. 29 dargestellten Zusammenhänge werden im weiteren Verlauf der Arbeit als "Futterband" bezeichnet. Es zeigten sich erhebliche Streuungen bei den RNA/DNA Verhältnissen innerhalb der jeweiligen Längenklassen und Individuen mit sehr geringen RNA/DNA Verhältnissen innerhalb der Futtergruppe, die auf einen schlechten Zustand trotz vorhandenen Futters schließen lassen.

#### Steinbutt

Um den Einfluß von verschiedenen Hungerzeiten auf das RNA/DNA Verhältnis bezogen zur jeweiligen Larvenlänge zu bestimmen, wurden die Ergebnisse der Hungerversuche in zwei Gruppen zusammengestellt. In der einen Gruppe wurden die RNA/DNA Verhältnisse von 2-3 Tage hungernden Steinbuttlarven in der anderen Gruppe die von 4-6 Tage hungernden Larven zusammengefaßt. Die Beziehungen zwischen RNA/DNA Verhältnis und Länge der untersuchten Larven der Futter- und Hungergruppen zeigt Abb. 30. Die Larven der Futtergruppe wiesen signifikant höhere RNA/DNA Quotienten im Vergleich zu den Hungergruppen auf (Kovarianz,  $p < 0.05$ ). Mit zunehmender Hungerzeit verringerte sich das RNA/DNA Verhältnis. Steinbuttlarven der "4-6 Tage Hunger- Gruppe" hatten signifikant geringere RNA/DNA Quotienten als die der "2-3 Tage Hunger- Gruppe". Wie zu erwarten, zeigten die hungernden Larven im Vergleich zur Futtergruppe ein geringeres Wachstum. Bei allen drei Gruppen konnte eine Zunahme der RNA/DNA Verhältnisse mit der Länge der Larven festgestellt werden. Längere Larven des gleichen Zustands zeigten höhere RNA/DNA Verhältnisse.

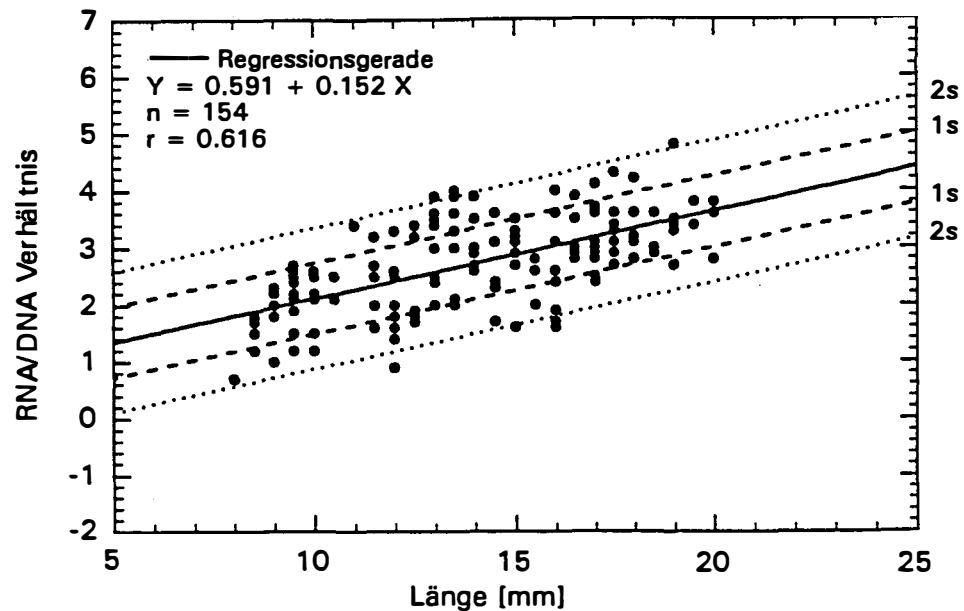


Abb. 29:

RNA/DNA Verhältnisse in Abhängigkeit von der Larvenlänge von gefütterten Larven (individuelle Werte). Die mittlere Linie wurde mittels linearer Regressionsanalyse angepaßt. Dargestellt ist zusätzlich die zweiseitige einfache (1s) und die zweiseitige zweifache (2s) Standardabweichung dieser Regressionsbeziehung (Heringslarvenaufzucht 1989).

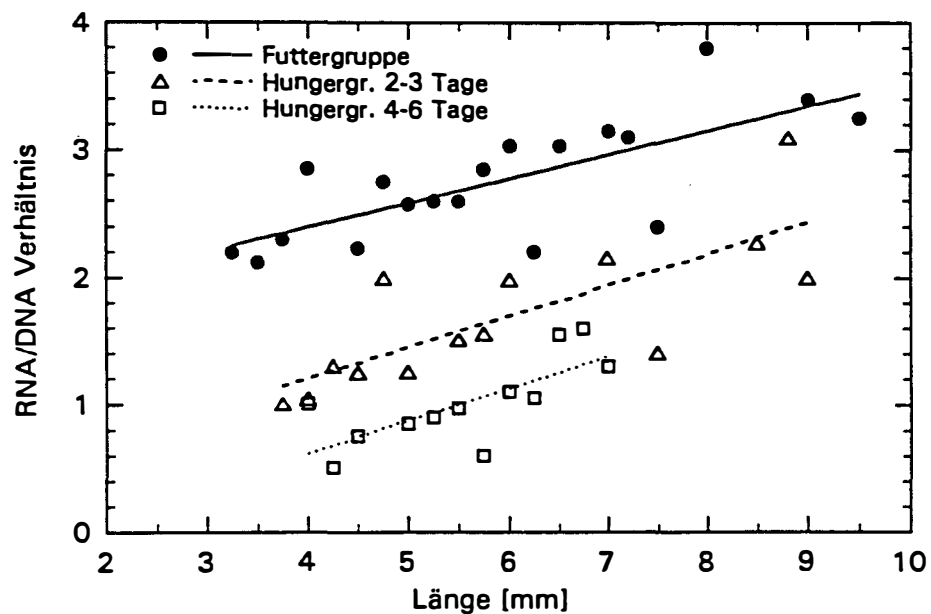


Abb. 30:

Mittlere RNA/DNA Verhältnisse bezogen auf die Larvenlänge in Abhängigkeit vom Ernährungszustand. Dargestellt sind Ergebnisse der Futtergruppe, der "2-3 Tage Hunger-" und der "4-6 Tage Hungergruppe" (Steinbuttlarvenaufzucht 1986).

### 3.3. EINFLUß VON WEITEREN FAKTOREN AUF DIE RNA/DNA VERHÄLTNISSE VON HERINGSLARVEN AUS DER LABORAUFZUCHT

#### 3.3.1 Futterorganismen im Darm der Larven

Um den Einfluß von Futterorganismen im Verdauungstrakt der Heringslarven auf die Bestimmung der RNA- und DNA-Gehalte beurteilen zu können, erfolgte eine Zuordnung der Heringslarven der Futtergruppe in die Kategorien Futter im Darm "ja/nein". Da der Verdauungstrakt der Larven wenig pigmentiert ist, ließ sich eine visuelle Betrachtung des Darminhaltes unter dem Binokular und die Zuordnung in eine der beiden Kategorien durchführen. Weder für die RNA- noch für die DNA- Gehalte konnten signifikante Unterschiede zwischen Larven beider Gruppen festgestellt werden (Abb. 31). Futterorganismen im Verdauungstrakt der Larven hatten damit keinen Einfluß auf das RNA/DNA Verhältnis.

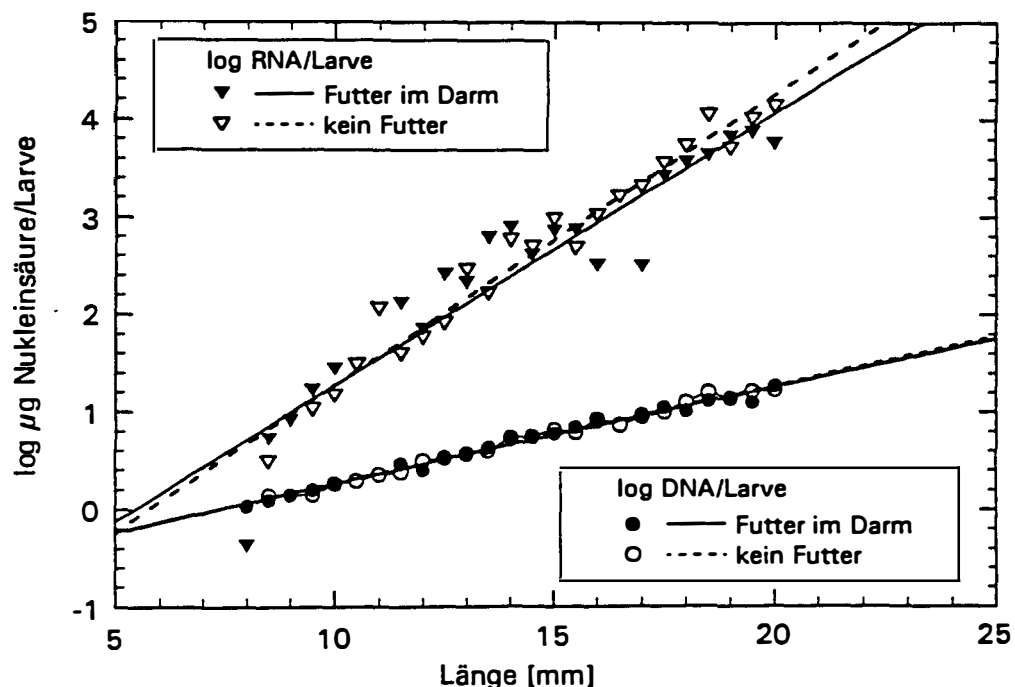


Abb. 31:

Mittlere RNA- und DNA- Gehalte pro Larve bezogen auf die Larvenlänge. Die Larven wurden in zwei Kategorien eingeteilt (Futter im Darm "ja/nein"). Die Linien geben die jeweiligen Regressionsgeraden wieder (Heringslarvenaufzucht 1989).

### 3.3.2 Futterdichte

Während der Heringslarvenaufzucht 1989 wurden eine hohe Futterdichte (5 *Brachionus* + 1 *Artemia*/ml) und eine geringe Futterdichte (0.1 *Brachionus* + 0.01 *Artemia*/ml) in den Versuchsbecken eingestellt. Bis auf Abweichungen im Alter von 13 Tagen zeigten die RNA/DNA Verhältnisse der Larven beider Versuchsgruppen einen vergleichbaren Kurvenverlauf mit Zunahmen und Abnahmen der RNA/DNA Verhältnisse bei gleichen Altersstufen (Abb. 32). Die RNA/DNA Verhältnisse der Larven der "hohen Futterdichtegruppe" lagen signifikant über den RNA/DNA Verhältnissen der "geringen Futterdichtegruppe". Die Varianzen der RNA/DNA Verhältnisse beider Futterdichtegruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede. Larven der "hohen Futterdichtegruppe" waren bei gleichem Alter länger und wiesen damit ein besseres Wachstum auf.

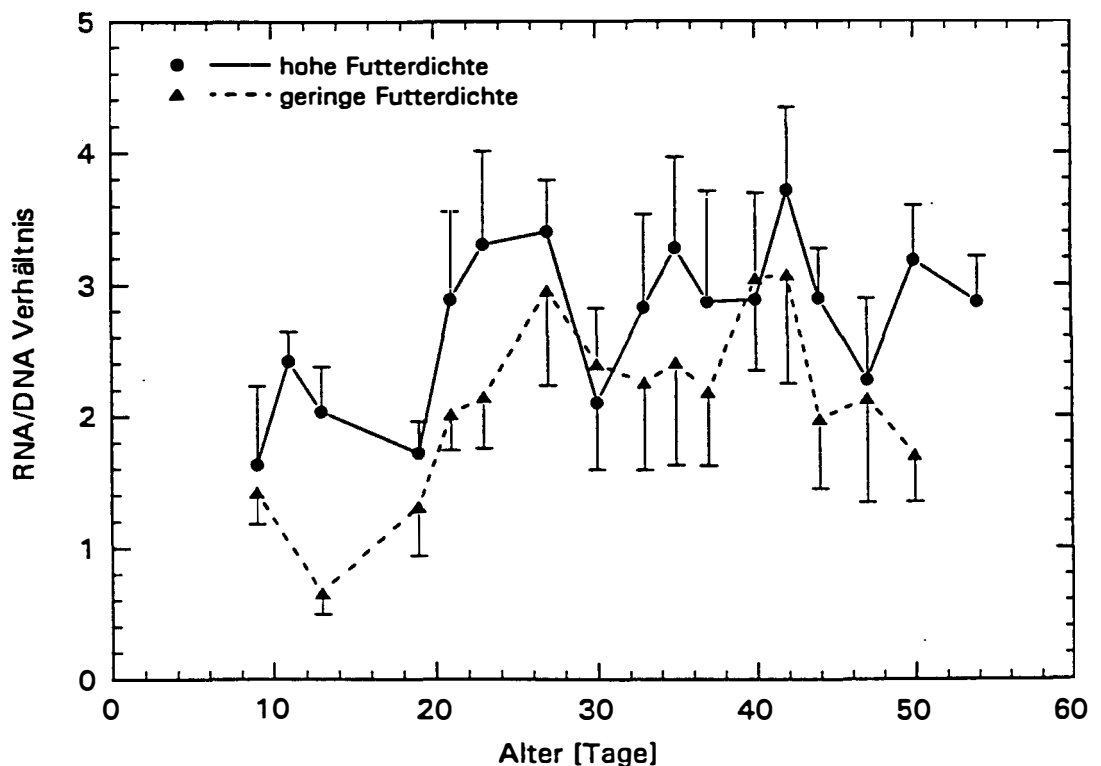


Abb. 32:

RNA/DNA Verhältnisse (Mittelwerte von 6-16 individuellen Bestimmungen) von Larven, die bei hoher und geringer Futterdichte gehalten wurden, in Abhängigkeit vom Alter. Eingezeichnet ist die einseitige Standardabweichung (Heringslarvenaufzucht 1989).

Der Vergleich der relativen Häufigkeitsverteilungen der RNA/DNA Verhältnisse von Heringslarven der beiden Futterdichtegruppen (Abb. 33) zeigt eine Verschiebung der RNA/DNA Verhältnisse der "hohen Futterdichtegruppe" zu höheren Werten und einen signifikant höheren Median der Verteilung im Vergleich zur "geringen Futterdichtegruppe" (U-Test,  $p < 0.05$ ).

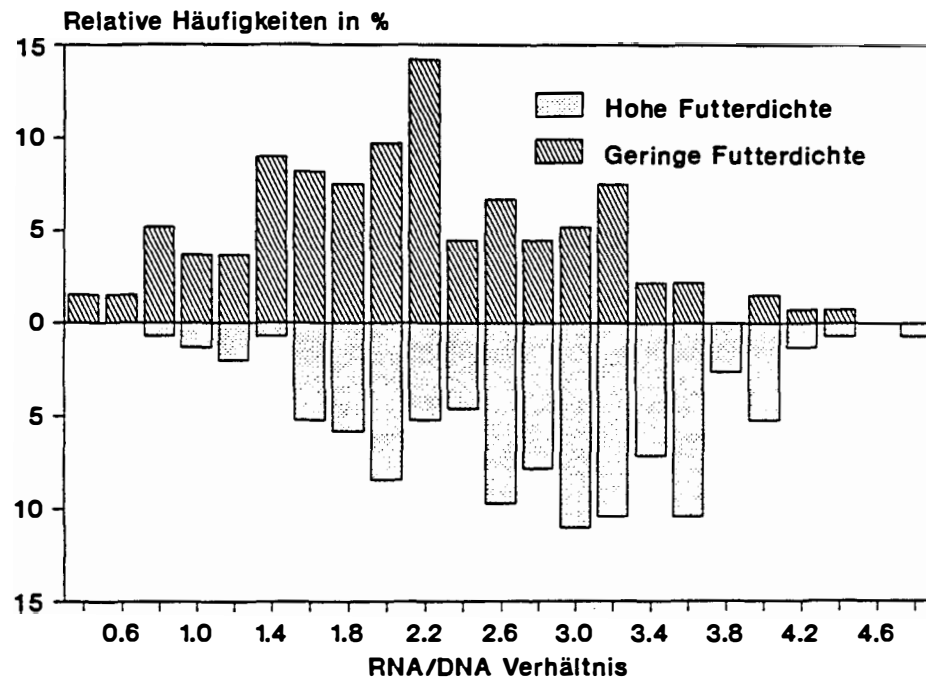


Abb. 33:

Relative Häufigkeitsverteilung der RNA/DNA Verhältnisse von Larven, die bei hoher (5 *Brachionus* + 1 *Artemia*/ml) sowie geringer Futterdichte (0.1 *Brachionus* + 0.01 *Artemia*/ml) gehalten wurden. Die RNA/DNA Intervalle sind in Bereiche mit einer Schrittweite von 0.2 eingeteilt (Heringslarvenaufzucht 1989).

### 3.3.3 Reaktion des RNA/DNA Verhältnisses auf Futterzugabe

#### RNA/DNA Verhältnisse im Tagesverlauf

Um festzustellen, ob die Futteraufnahme der Heringslarven zu einer meßbaren Veränderung der RNA/DNA Verhältnisse im Verlauf eines Tages führt, wurden Heringslarven vor und dann in zweistündigem Abstand nach der Fütterung beprobt. Die Ergebnisse von 30, 37 und 42 Tage alten Heringslarven sind in Abb. 34 dargestellt. Die RNA/DNA Verhältnisse der Larven der einzelnen Probennahmen streuten sehr stark, so daß eine signifikante tageszeitliche Abhängigkeit der RNA/DNA Verhältnisse nicht zu erkennen war.



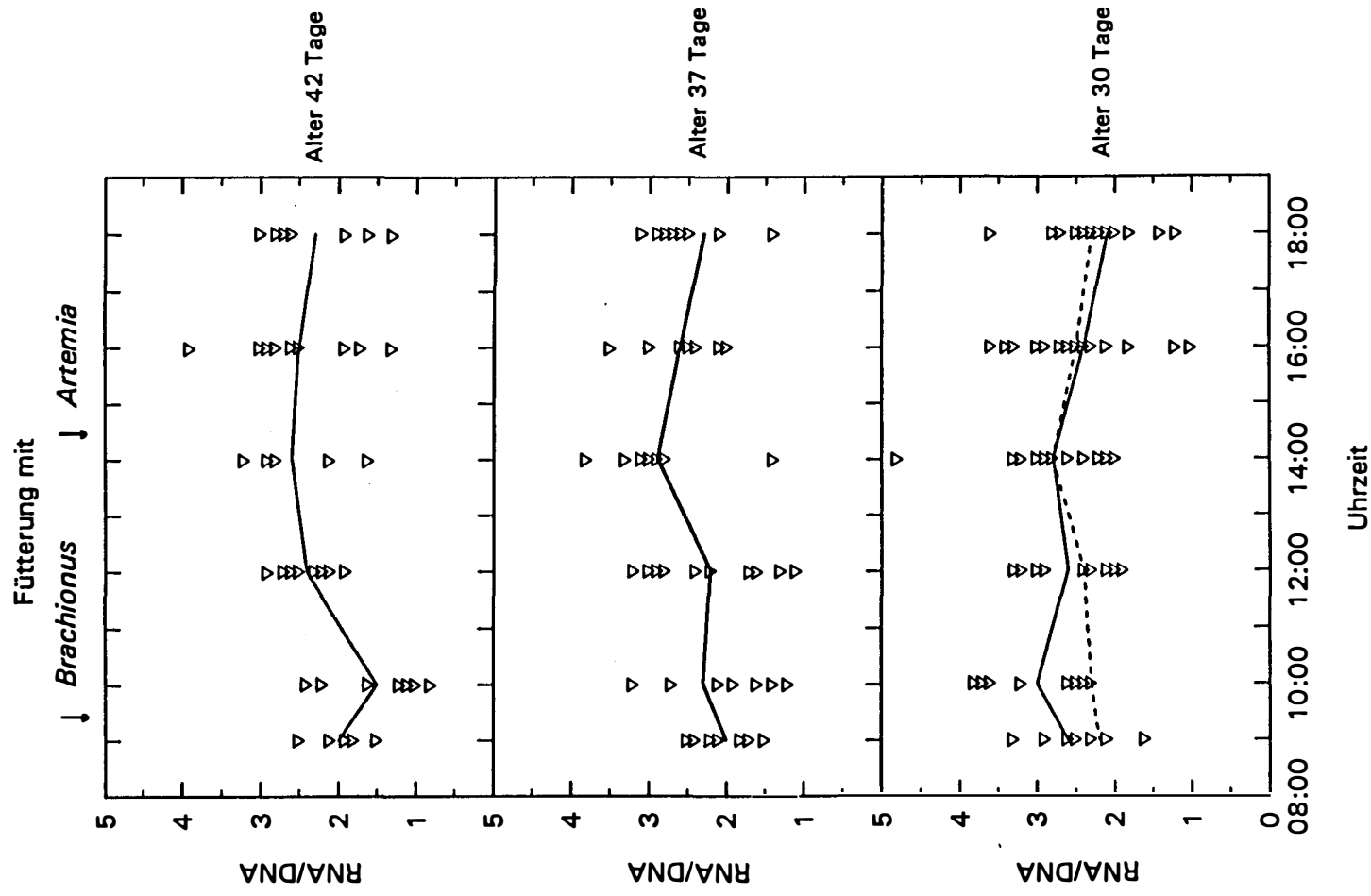


Abb. 34:

Individuelle RNA/DNA Verhältnisse im Verlauf eines Futtertages von 30, 37 und 42 Tage alten gefütterten Larven (hohe Futterdichte). Linien verbinden die Mittelwerte, Pfeile kennzeichnen den Zeitpunkt, an dem die Fütterung erfolgte. Die unterbrochene Linie bei den 30 Tage alten Larven gibt die Mittelwerte der RNA/DNA Verhältnisse der drei Altersgruppen zu den jeweiligen Probenahmezeiten wieder (Heringslarvenaufzucht 1989).

Auch die über alle Altersgruppen gemittelten RNA/DNA Verhältnisse ergaben keinen tagesperiodischen Effekt. Diese Ergebnisse zeigen, daß das RNA/DNA Verhältnis nicht auf kurzzeitige Veränderungen im Futterangebot reagiert.

Tag- und Nachthols von Heringslarven aus dem Englischen Kanal wurden vergleichend analysiert, um festzustellen, ob die Tageszeit, zu der Larven im Feld gefangen wurden, einen Einfluß auf die RNA/DNA Verhältnisse hat. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den RNA/DNA Verhältnissen zwischen Tag- und Nachtfängen festgestellt werden (Varianzanalyse,  $p < 0.05$ ).

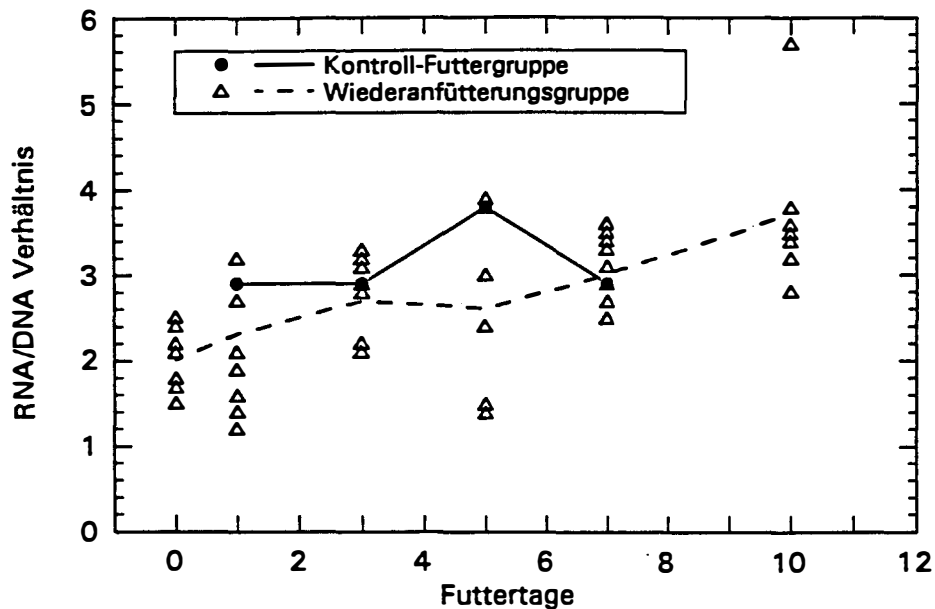
#### **Reaktion des RNA/DNA Verhältnisses auf Wiederaufütterung**

Larven, die vier Tage gehungert hatten, wurden wiederangefüttert und im Abstand von 2-3 Tagen beprobt. Parallel dazu wurden die RNA/DNA Verhältnisse von Larven einer Futter-Kontrollgruppe analysiert. Die RNA/DNA Verhältnisse der wiederangefütterten Larven nahmen während des Versuches kontinuierlich zu, hatten den Wert der Kontrollgruppe nach 7 Tagen wiedererlangt und lagen danach sogar höher (Abb. 35).

#### **3.3.4 Temperatur**

Um den Einfluß der Temperatur auf das RNA/DNA Verhältnis von Heringslarven zu ermitteln, wurden 28-37 Tage alte Heringslarven bei 10 °C sowie bei 14-16 °C (Kontrollgruppe) aufgezogen. Die erste Probennahme erfolgte nach drei Tagen im Alter von 30 Tagen, nachdem die Larven sich an die geringere Temperatur angepaßt hatten. Beim Vergleich der RNA- und DNA- Gehalte der Larven beider Gruppen, zeigten sich signifikante Unterschiede (Kovarianzanalyse,  $p < 0.05$ ; Abb. 36). Larven, die bei der niedrigeren Temperatur gehalten wurden, hatten bei gleichem Alter geringere DNA- und RNA- Gehalte und waren damit im Wachstum reduziert. Den Zusammenhang zwischen DNA-, RNA- Gehalt und Larvenlänge zeigt Abb. 37. Längennormiert ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den RNA- und DNA- Gehalten beider Temperaturgruppen feststellen (Varianz- Analyse,  $p < 0.05$ ).

Die Analyse der RNA/DNA Verhältnisse der Larven beider Temperaturgruppen ergab sowohl bezogen auf das Alter als auch auf die Länge keine signifikanten Unterschiede.

**Abb. 35:**

Individuelle RNA/DNA Verhältnisse von Larven, die nach 4 Hungertagen wieder angefüttert wurden und nach 1,3,5,7 und 10 Tagen der Fütterung analysiert wurden. Die gestrichelte Linie verbindet die Mittelwerte der wiederangefütterten Larven. Dargestellt sind zusätzlich die Mittelwerte der Kontrollgruppe, die während des gesamten Versuchszeitraumes Futter erhielt. Werte am Tag "0" entsprechen den RNA/DNA Verhältnissen 4 Tage hungernder Larven (Heringslarvenaufzucht 1989).

### 3.4 VERGLEICH DER ERGEBNISSE DER RNA/DNA BESTIMMUNGEN AN HERINGS- UND STEINBUTTLARVEN

Für einen direkten Vergleich der RNA/DNA Verhältnisse der Heringslarven der Aufzuchten 1986 und 1989 mußten die RNA/DNA Verhältnisse aus der Aufzucht 1989 mit einem Korrektur- Faktor von 1.22 (siehe 3.1.3) multipliziert werden. Die RNA/DNA Verhältnisse gefütterter Heringslarven beider Aufzuchten zeigten die in Abb. 38 dargestellten relativen Häufigkeiten, die sehr ähnliche Verteilungen und keine signifikanten Unterschiede der Mediane aufwiesen. Der methodenkorrigierte Median der 1989er RNA/DNA Verteilung lag bei 3.3, der Median der 1986er Population bei 3.6. Bei den Heringslarven aus beiden Aufzuchten ließen sich innerhalb der Futtergruppe Larven mit RNA/DNA Verhältnissen, charakteristisch für hungernde Larven,

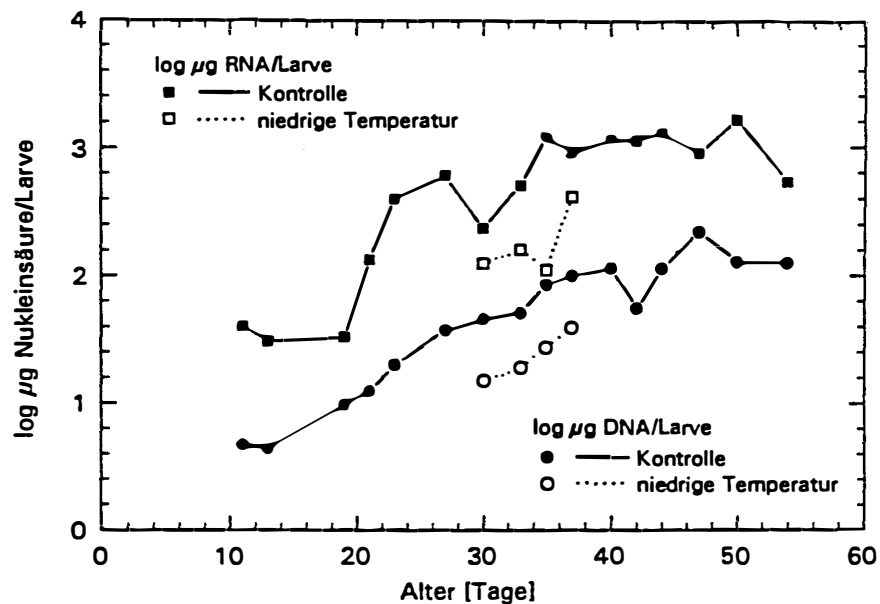


Abb. 36:

Mittlere RNA- und DNA- Gehalte pro Larve in Abhängigkeit vom Larvenalter von gefütterten Heringslarven, die bei verschiedenen Temperaturen gehalten wurden. (Kontrollgruppe = 14-16 °C; niedrige Temperatur = 10 °C; Heringslarvenaufzucht 1989).

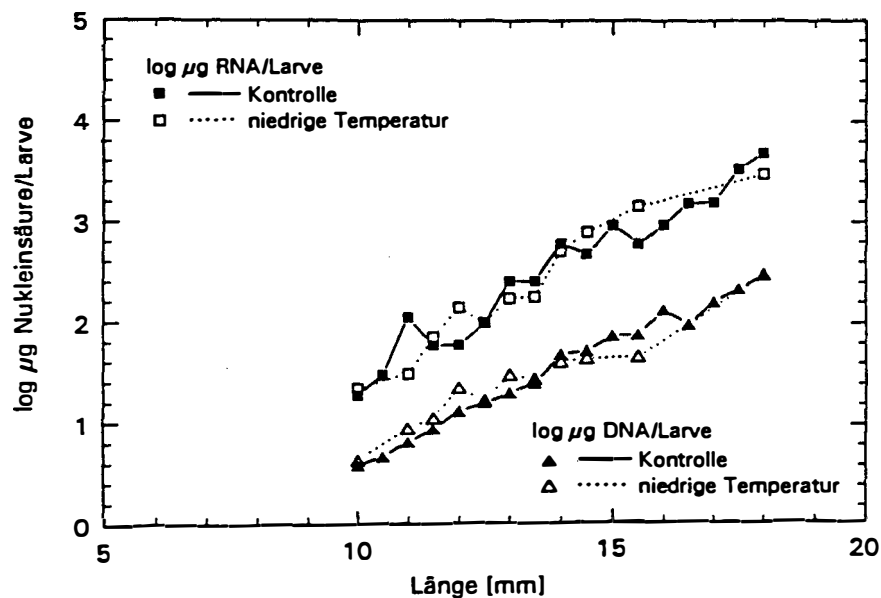
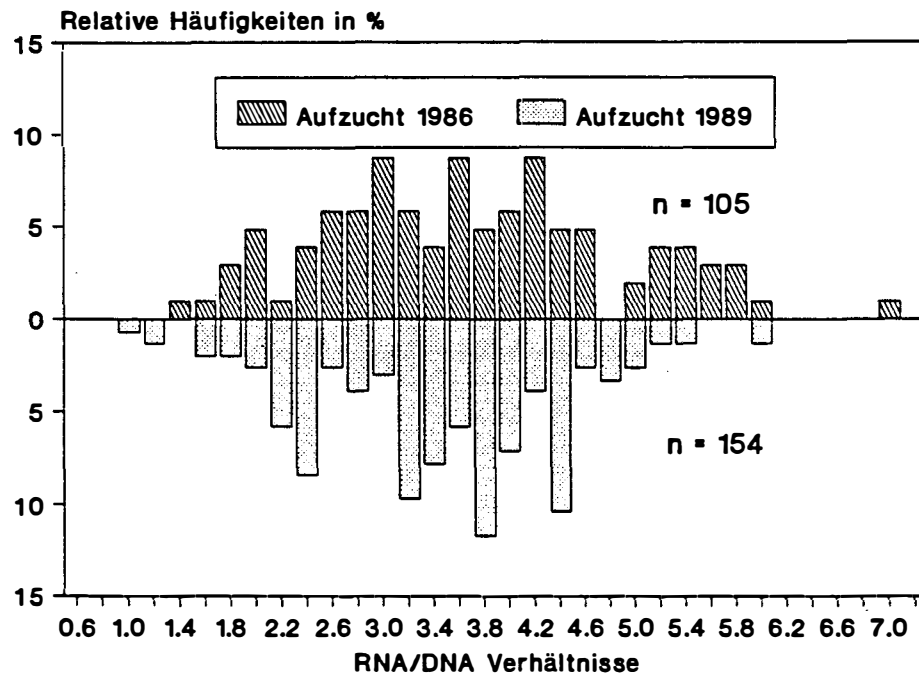


Abb. 37:

Mittlere RNA- und DNA- Gehalte pro Larve in Abhängigkeit von der Larvenlänge von gefütterten Heringslarven, die bei verschiedenen Temperaturen gehalten wurden. (Kontrollgruppe = 14-16 °C; niedrige Temperatur = 10 °C; Heringslarvenaufzucht 1989).

finden. Die Unterschiede in den Futterdichten (siehe Legende, Abb. 38) wirkten sich nicht auf die RNA/DNA Verhältnisse der Larven aus. Die im Rahmen der Aufzucht 1986 eingestellte geringere Futterdichte scheint damit ausreichend zu sein; eine Erhöhung der Futterdichte führte zu keiner Verbesserung im mittleren Ernährungszustand.



**Abb. 38:**

Relative Häufigkeitsverteilungen der RNA/DNA Verhältnisse der Heringslarven, die bei einer Futterdichte von 3 *Brachionus* + 0.1 *Artemia*/ml (Aufzucht 1986) und von 5 *Brachionus* + 1 *Artemia*/ml (Aufzucht 1989) gehältert wurden. Bei den Daten der Aufzucht 1989 handelt es sich um korrigierte Werte (Methodenkorrekturfaktor), um einen direkten Vergleich mit den Ergebnissen der Aufzucht 1986 zu ermöglichen. Die RNA/DNA Intervalle sind in Bereiche mit einer Schrittweite von 0.2 eingeteilt.

Das längste Hungerintervall während der 1986er Aufzucht betrug 6 Tage und führte zu einer Reduktion des RNA/DNA Verhältnisses auf einen Wert von 2.3. Im Vergleich dazu lag das mittlere methodenkorrigierte RNA/DNA Verhältnis von 6 Tage hungernden Heringslarven der 1989er Aufzucht bei 2.1 und war damit gut vergleichbar.

Auch der Vergleich der relativen Häufigkeiten der RNA/DNA Verhältnisse gefütterter Herings- und Steinbuttlarven zeigte ähnliche Verteilungen (Abb. 39) und keinen signifikanten Unterschied der Mediane (Hering 1989: Median = 2.8, Steinbutt:

Median = 2.7; U-Test,  $p < 0.05$ ). Die Ergebnisse waren direkt vergleichbar, da die gleiche Nukleinsäureanalytik verwendet wurde. Der Anteil schlecht ernährter Steinbuttlarven innerhalb der Futtergruppe war weitaus geringer im Vergleich zum Hering. Auch zeigten die hungernden Steinbuttlarven keine RNA/DNA Verhältnisse über 1.6, so daß die Trennung zwischen Futter- und Hungergruppe im Vergleich zu den Heringslarven besser war (siehe Abb. 22, Seite 44 & Abb. 24, Seite 46).

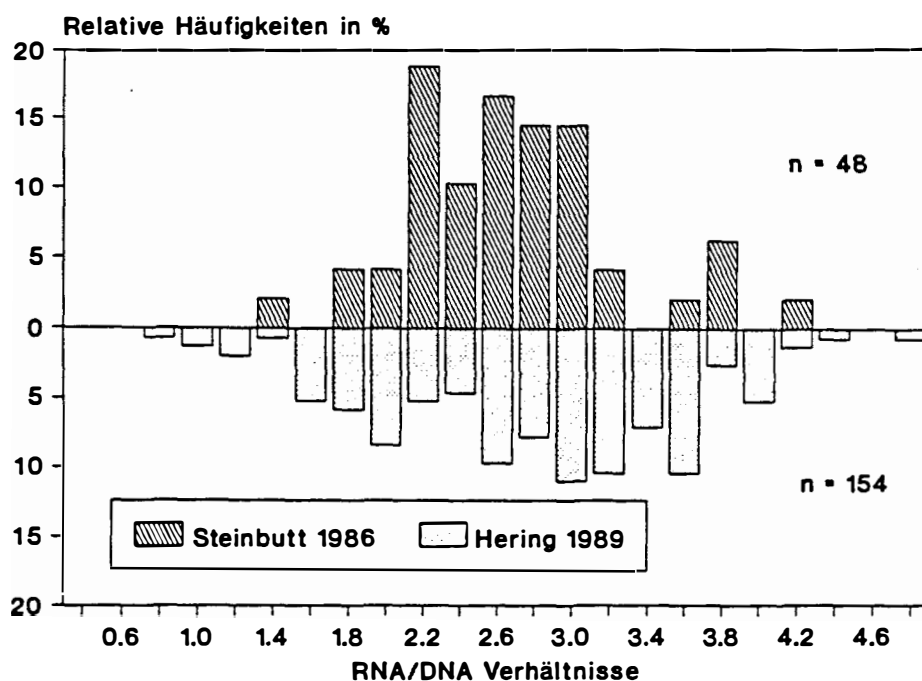


Abb. 39:

Relative Häufigkeitsverteilungen der RNA/DNA Verhältnisse von Heringslarven, die bei einer Futterdichte von 5 *Brachionus* + 1 *Artemia*/ml (Aufzucht 1989) gehältert wurden, und von Steinbuttlarven, die bei einer Futterdichte von 2 *Brachionus* + 0.5 *Artemia*/ml (Aufzucht 1986) aufgezogen wurden. Die RNA/DNA Intervalle sind in Bereiche mit einer Schrittweite von 0.2 eingeteilt.

Unterschiede zwischen beiden Fischarten ergaben sich in der Reaktion der RNA/DNA Verhältnisse auf Hungerzeiten (Abb. 40). Steinbuttlarven zeigten schon nach 4-5 Hungertagen sehr geringe RNA/DNA Verhältnisse, die Heringslarven erst nach 9 Hungertagen erreichten.

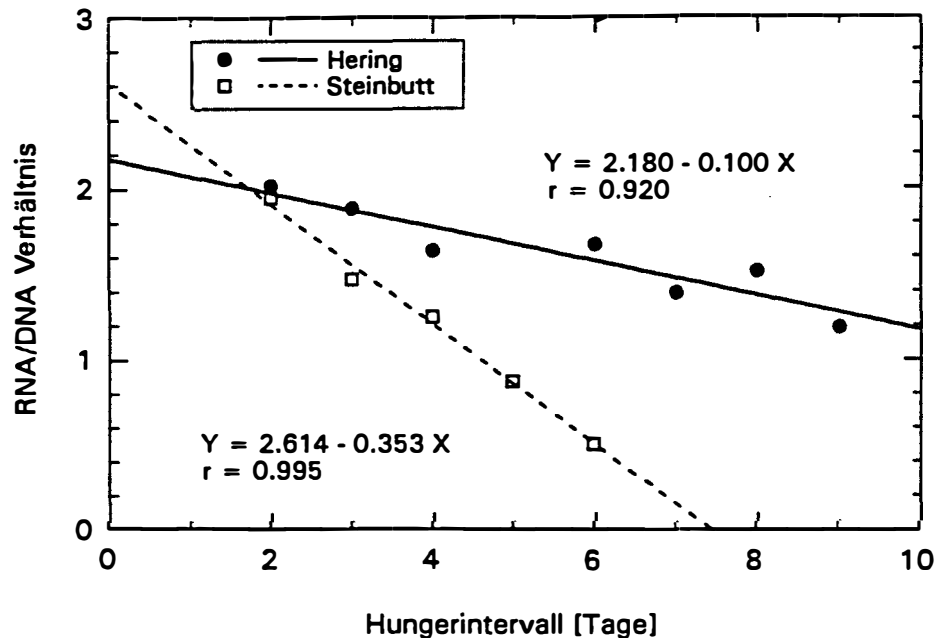


Abb. 40:

Beziehung zwischen RNA/DNA Verhältnis und Länge des Hungerintervalls bei Herings- und Steinbuttlarven. Dargestellt sind Mittelwerte und die an diese angepaßten Regressionsgeraden (Heringslarvenaufzucht 1989, Steinbuttlarvenaufzucht 1986).

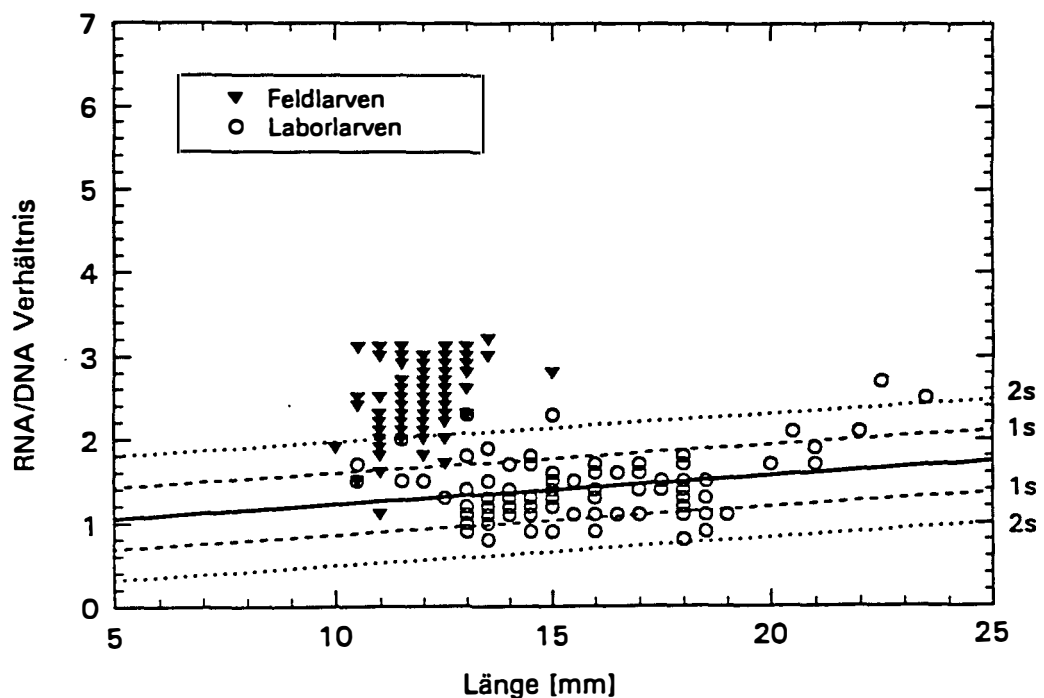
### 3.5 BESTIMMUNG DES ERNÄHRUNGSZUSTANDES VON HERINGSLARVEN AUS FELDUNTERSUCHUNGEN

Im Rahmen der Rekrutierungsproblematik stellt sich die Frage, ob Hungern in See eine Rolle spielt, welche Entwicklungsstadien von Fischlarven besonders anfällig für Verhungern sind und ob unterschiedliche Futtersituationen in der Natur zu unterschiedlich ernährten Larven führen können. Einen weiteren Aspekt dieser Arbeit bildete daher die Anwendung der im Labor erarbeiteten Beurteilungskriterien für eine Untersuchung des Ernährungszustandes von Heringslarven, die unter ökologisch unterschiedlichen Bedingungen aufwachsen. Dafür wurden Heringslarven, die im Winter bei geringen Planktondichten im Englischen Kanal aufwachsen (SCHADT 1986), mit

Heringen aus dem Aufwuchsgebiet nördlich Schottlands (nördliche Nordsee), die dort im Sommer bei hohen Planktondichten leben (SCHADT 1986), vergleichend untersucht. Dabei wurde von der Hypothese ausgegangen, daß der Ernährungszustand der Heringslarven aus dem Englischen Kanal im Mittel schlechter sein sollte. Zusätzlich wurden Heringslarven aus dem Nord-Ostsee-Kanal (mittlere Planktondichten) und aus der Schlei (hohe Planktondichten; NELLEN 1965, SCHNACK 1972) analysiert.

### 3.5.1 Bestimmung des Anteils hungernder Heringslarven aus Feldproben anhand des "Hungerbandes"

Die individuellen RNA/DNA Verhältnisse der Feldlarven aus den Untersuchungsgebieten nördliche Nordsee, Englischer Kanal, Nord-Ostsee-Kanal und Schlei in Abhängigkeit von der Länge im Vergleich zum "Hungerband" (1s- und 2s-Bereich) von 6-9 Tage hungernden Labor- Heringslarven sind in Abb. 41 - 45 dargestellt.



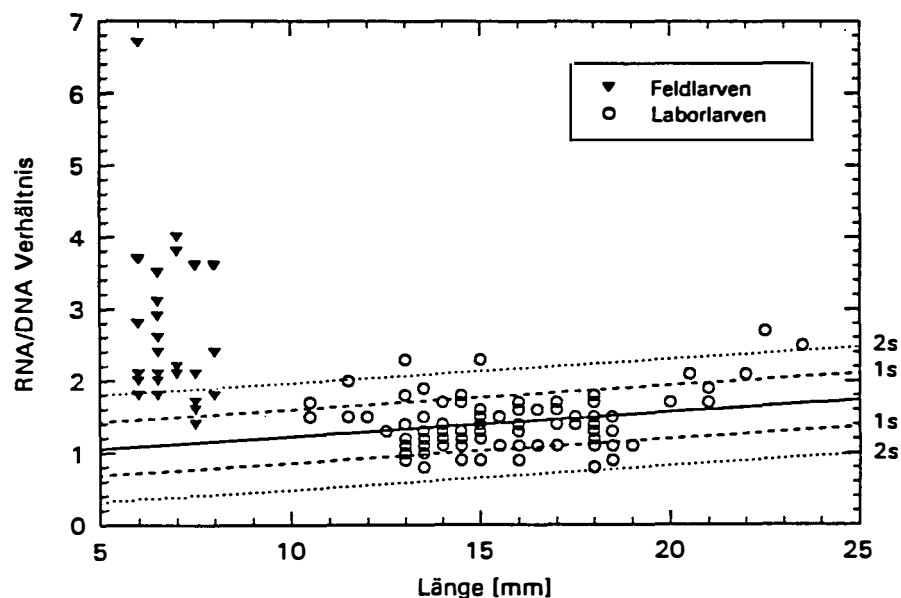
**Abb. 41:**

Zuordnung der Larven aus dem Englischen Kanal in das im Rahmen der Laboraufzuchtversuche erstellte "Hungerband". Dargestellt ist die längenabhängige Beziehung der individuellen RNA/DNA Verhältnisse von 6-9 Tage unter Laborbedingungen hungernden Heringslarven, die angepaßte Regressionsgerade und die zweiseitige einfache (1s) und zweifache (2s) Standardabweichung der Regression.



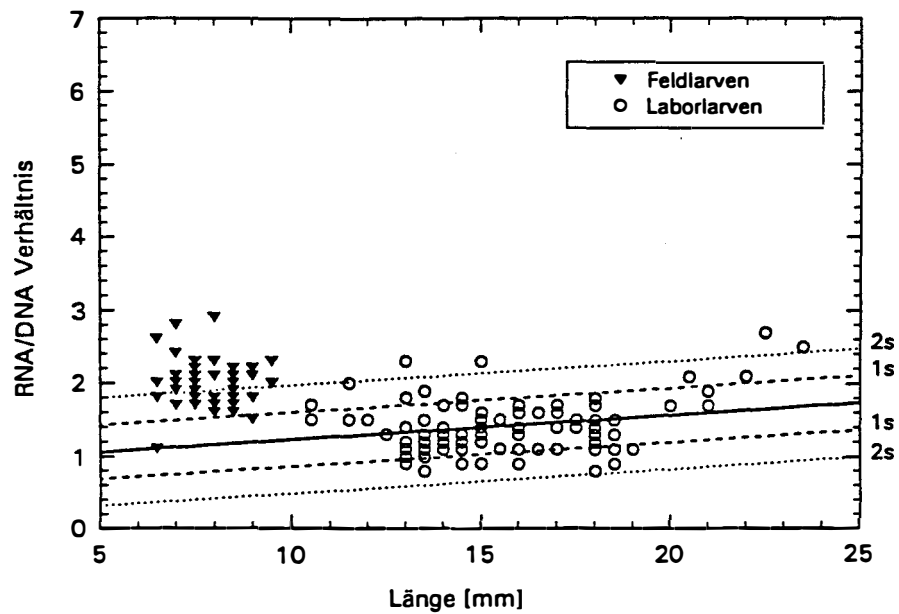
Im Englischen Kanal wurden hungernde Larven nur in den Größengruppen zwischen 10-12.5 mm gefunden. Je nach Wahl des Standardabweichungsbereichs (1s bzw. 2s) waren es zwischen 2.7 % und 9.5 % (Abb. 41).

Beim Vergleich der drei Stationen aus der nördlichen Nordsee (Station 510, Station "Nordwest-Schottland", Station 703) ließ sich zeigen, daß nur bei den kleinen Längengruppen (6-9 mm) hungernde Individuen auftraten (Abb. 42 - 44). Bei Verwendung des einfachen Standardabweichungsbereichs wurden zwischen 1.8 % und 3.7 % aller untersuchten Larven der Stationen aus der nördlichen Nordsee als hungernd eingestuft, bei der Wahl des zweifachen Standardabweichungsbereichs vergrößerte sich der Anteil auf 22.2 % bzw. 38.6 % (Tab. 5). Alle Larven, die auf der Dauerstation bei Kap Wrath (nördliche Nordsee, Stat. 703) gefangen wurden, waren deutlich größer (11-18 mm) und zeigten RNA/DNA Verhältnisse oberhalb des "Hungerbandes" und hungerten demnach nicht (Abb. 44).

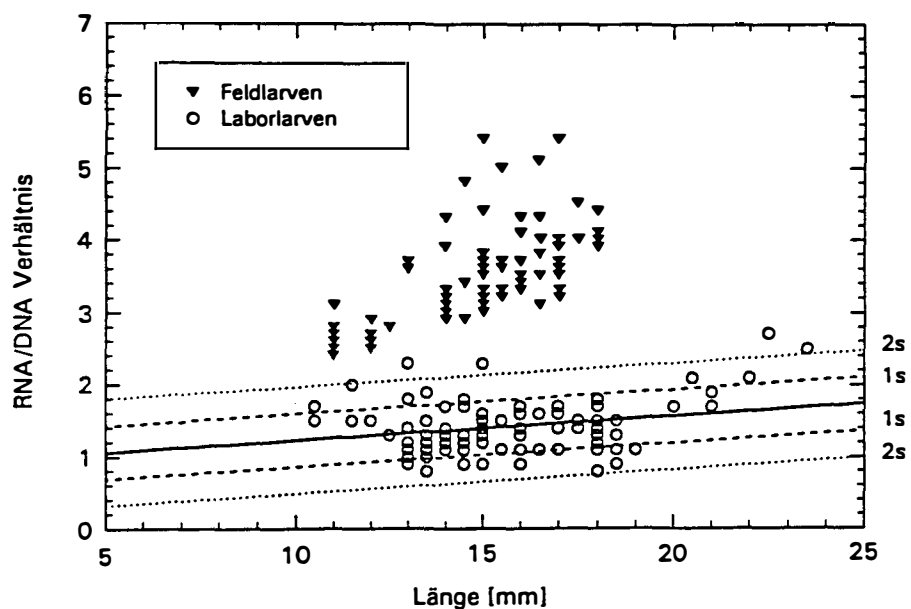


**Abb. 42:**

Zuordnung der Feldlarven aus der nördlichen Nordsee (Station 510) in das im Rahmen der Laboraufzuchtversuche erstellte "Hungerband" (siehe Abb. 41).

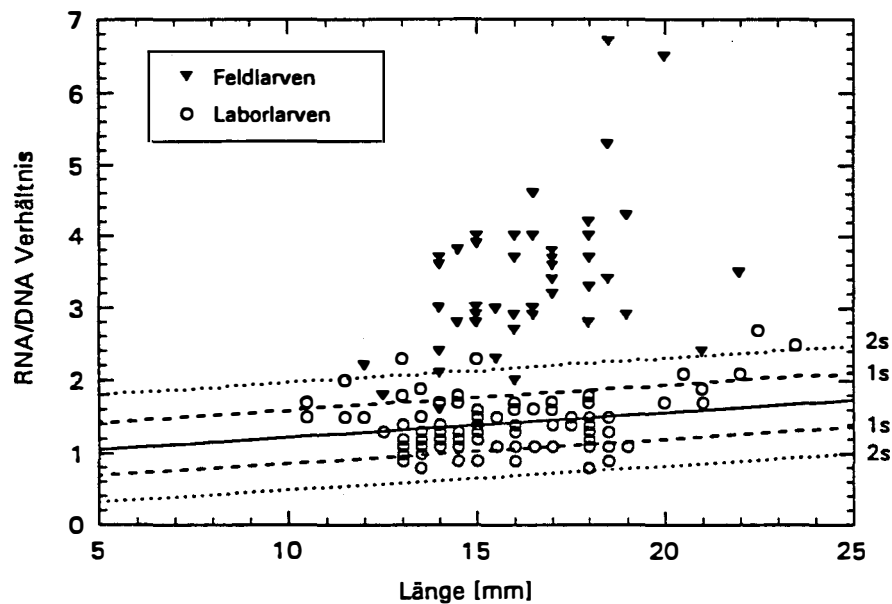
**Abb. 43:**

Zuordnung der Feldlarven aus der nördlichen Nordsee (Station "Nordwest-Schottland") in das im Rahmen der Laboraufzuchtversuche erstellte "Hungerband" (siehe Abb. 41).

**Abb. 44:**

Zuordnung der Feldlarven aus der nördlichen Nordsee (Station 703) in das im Rahmen der Laboraufzuchtversuche erstellte "Hungerband" (siehe Abb. 41).

Im Nord-Ostsee-Kanal wurden hungernde Larven nur in den Längengruppe zwischen 12.5-16 mm bestimmt. Je nach Wahl des Standardabweichungsbereichs (1s bzw. 2s) waren es zwischen 2.1 % und 8.3 % aller untersuchten Larven (Abb. 45).



**Abb. 45:**

Zuordnung der Feldlarven aus dem Nord-Ostsee-Kanal in das im Rahmen der Laboraufzuchtversuche erstellte "Hungerband" (siehe Abb. 41).

Die Beurteilung des Ernährungszustandes von Heringslarven aus der Schlei, die an zwei Probennahmeterminen in einwöchigem Abstand genommen wurden, ist in Abb. 46 dargestellt. Keine der untersuchten Larven der ersten Probennahme konnte als hungernd eingestuft werden. Die RNA/DNA Verhältnisse der Larven der zweiten Probennahme waren deutlich niedriger und zeigten 20 % (1s) bzw. 80 % (2s) hungernde Larven.

Bis auf eine Ausnahme (eine Larve aus der Probennahme im Englischen Kanal) lagen die RNA/DNA Verhältnisse aller Larven aus allen Felduntersuchungen nur im oberen 1s- und 2s- Bereich des "Hungerbandes".

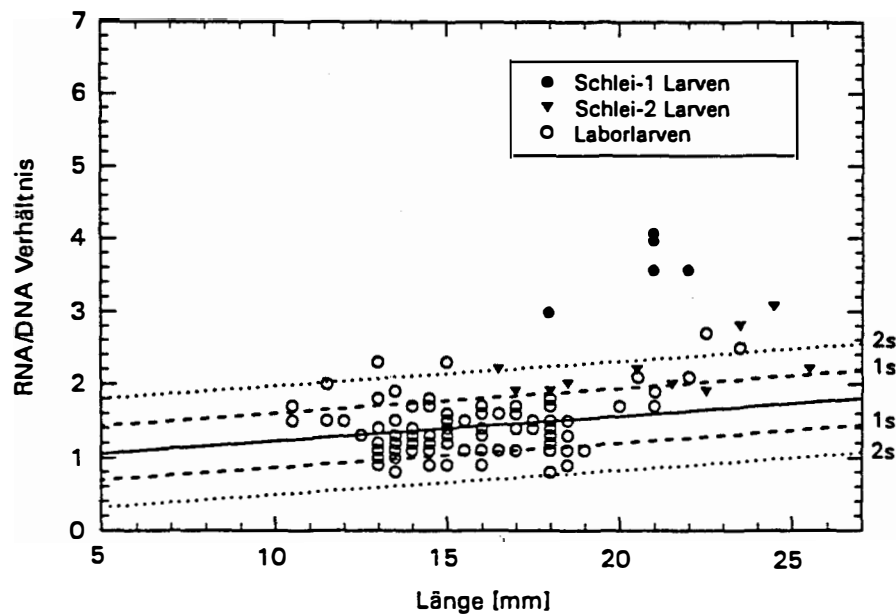


Abb. 46:

Zuordnung der Feldlarven aus der Schlei (Probennahmetermine 01.06. & 07.06.89) in das "Hungerband". Dargestellt ist die längenabhängige Beziehung der individuellen RNA/DNA Verhältnisse von 6-9 Tagen unter Laborbedingungen hungernden Heringslarven, die angepaßte Regressionsgerade und die zweiseitige einfache (1s) und zweifache (2s) Standardabweichung der Regression.

Der Anteil hungernder Heringslarven aus den jeweiligen Untersuchungsgebieten ist in Tab. 5 zusammengefaßt. Bei der Beurteilung anhand des einfachen Standardabweichungsbereiches wurden je nach Untersuchungsgebiet zwischen 1.8 % und 3.7 % hungernde Larven ermittelt (ohne Berücksichtigung der zweiten Schlei-Probennahme). Durch Einbeziehen des zweifachen Standardabweichungsbereiches lag der Anteil hungernder Larven in den Untersuchungsgebieten zwischen 8.3 % und 38.6 %. Der höchste Anteil hungernder Larven aus den vier Untersuchungsgebieten, ohne Berücksichtigung der Ergebnisse der zweiten Schlei-Probennahme, war bei den kleineren Längengruppen (6-9.5 mm) zu finden. Bei den größeren Larven (10-22 mm) konnten entweder keine hungernden Individuen bestimmt werden (nördliche Nordsee, Station 703) oder nur geringe Anzahlen als hungernd eingestuft werden (8.3 % Englischer Kanal & 9.5 % Nord-Ostsee-Kanal). Damit scheint das Verhungern der Larven bei den kleineren und damit wahrscheinlich jüngeren Larven eine größere Rolle zu spielen. Die hohen Anteile hungernder Larven der zweiten Probennahme aus der Schlei mit 20 % bzw. 80 % sind mit den Ergebnissen der ersten Probennahme nicht vergleichbar und entsprachen nicht den Erwartungen (siehe Diskussion, Seite 97).

**Tab. 5:**

Bestimmung des prozentualen Anteils von hungernden Heringslarven aus in situ Fängen anhand der Daten von 6-9 Tage hungernden Heringslarven aus Laborversuchen. Die Beurteilung erfolgte anhand der "engen" Hungerdefinition (1s- Band) und der weitergefaßten Hungerdefinition (2s- Band).

Gebiet	Anteil hungernder Larven [%]		Standardlänge der Larven [mm]	Gesamtanzahl untersuchter Larven
	1s-Hungerb.	2s-Hungerb.		
Englischer Kanal	2.7	9.5	10-15	148
Nord-Ostsee-Kanal	2.1	8.3	12-22	48
nördliche Nordsee St. 510	3.7	22.2	6-8	27
nördliche Nordsee St. Nordwest-Schottland	1.8	38.6	6.5-9.5	57
nördliche Nordsee St. 703	0.0	0.0	11-18	79
Schlei 1. Proben-nahme	0.0	0.0	18-22	5
Schlei 2. Proben-nahme	20.0	80.0	16.5-25	10

### 3.5.2 Vergleich der Ernährungslage der Heringslarven aus den verschiedenen Untersuchungsgebieten

Wie unter 3.2.3 gezeigt, ergaben die Laboruntersuchungen eine Längenabhängigkeit der RNA/DNA Verhältnisse. Größere Larven zeigten bei gleichem Ernährungszustand höhere RNA/DNA Quotienten als kleinere Larven. Daher kann es bei einem Vergleich der Ernährungslage von zwei Larvenpopulationen unterschiedlicher Längen zu einer

Fehleinschätzung kommen, wenn die RNA/DNA Verhältnisse ohne Berücksichtigung der Larvenlänge betrachtet werden. So muß gemäß "Hungerband"- Definition ein RNA/DNA Verhältnis kleiner als 2.0 bei 10 mm langen Larven als hungernd definiert werden, wohingegen 20 mm lange Larven erst mit RNA/DNA Verhältnissen unterhalb von 2.4 als hungernd eingestuft werden. Der direkte Vergleich der RNA/DNA Verhältnisse von Heringslarven aus unterschiedlichen Untersuchungsgebieten ist daher ohne Betrachtung der Längenabhängigkeit nicht möglich. Daher konnten die RNA/DNA Verhältnisse von Heringslarven aus der nördlichen Nordsee, dem Englischen Kanal und dem Nord-Ostsee-Kanal nur für Längengruppen, die in allen Gebieten vorkamen, vergleichend betrachtet werden. Dies gilt auch für den Vergleich des mittleren Ernährungszustandes anhand der relativen Häufigkeitsverteilungen der RNA/DNA Verhältnisse.

#### **Vergleich : Nördliche Nordsee - Englischer Kanal**

Der Vergleich der Ernährungssituation von Heringslarven der nördlichen Nordsee und dem Englischen Kanal erfolgte für die Längengruppen 10-14 mm (Abb. 47). Alle Larven der nördlichen Nordsee zeigten RNA/DNA Verhältnisse oberhalb des "Hungerbandes". Im Gegensatz dazu wurden im Englischen Kanal 9.5 % hungernde Larven (2s-Bereich) gefunden. Die Häufigkeitsverteilung der RNA/DNA Verhältnisse von Larven aus dem Englischen Kanal war im Vergleich zur nördlichen Nordsee zu geringeren Werten und damit schlechter ernährten Larven verschoben. Die höchsten RNA/DNA Verhältnisse der Larven aus dem Englischen Kanal lagen bei 3.2 im Vergleich zu 4.4 für die Larven der Längengruppe 10-14 mm aus der nördlichen Nordsee. Weiterhin konnten nur bei Larven aus dem Englischen Kanal RNA/DNA Werte unterhalb von 2.5 festgestellt werden. Damit zeigten sie im Vergleich einen generell schlechteren Ernährungszustand.

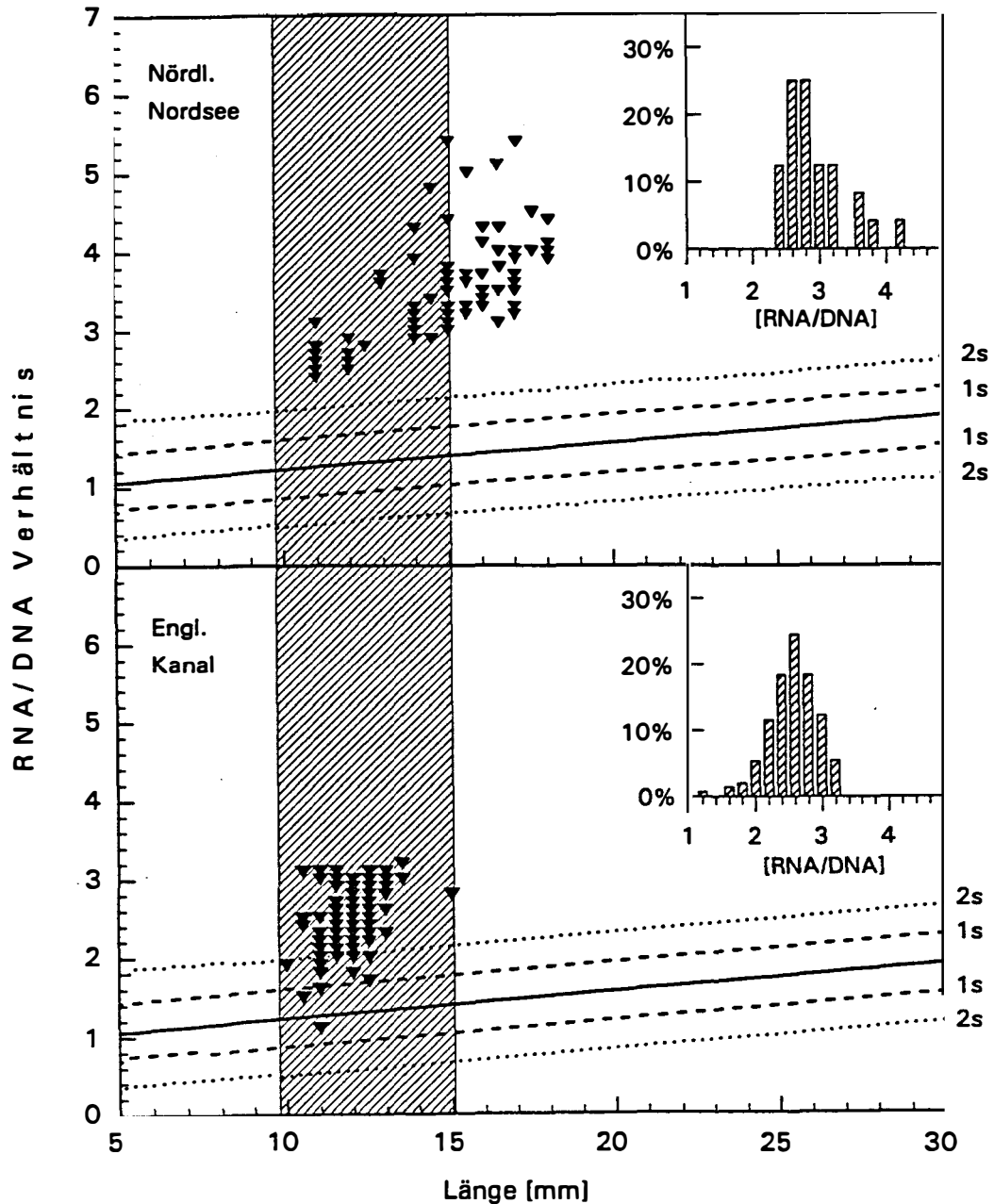


Abb. 47:

Vergleich der individuellen RNA/DNA Verhältnisse von Heringslarven aus der nördlichen Nordsee und dem Englischen Kanal im Vergleich zum Labor- "Hungerband". Der schraffierte Teil zeigt die Längenbereiche, die für den Gebietsvergleich verwendet wurden und die Grundlage für die in der Graphik dargestellten RNA/DNA Häufigkeitsverteilungen lieferten.

**Vergleich: Englischer Kanal - Nord-Ostsee-Kanal**

Ein Vergleich der Ernährungslage von Larven aus dem Englischen Kanal und dem Nord-Ostsee-Kanal war nur für den Längenbereich 12-15 mm möglich (Abb. 48). Bei den Larven aus dem Nord-Ostsee-Kanal wurden 18.8 % (2s) und aus dem Englischen Kanal 4.0 % (2s) hungrige Larven gefunden. Beim Vergleich der relativen RNA/DNA Häufigkeitsverteilungen beider Gebiete ließen sich signifikante Unterschiede in den Medianen beider Verteilungen feststellen (Englischer Kanal: Median = 2.6, Nord-Ostsee-Kanal: Median = 2.9; U-Test  $p < 0.05$ ). Weiterhin ergaben sich deutliche Unterschiede im Verteilungsmuster der RNA/DNA Verhältnisse. Die RNA/DNA Verhältnisse der Larven aus dem Nord-Ostsee-Kanal streuten über einen Bereich 1.4 - 4.0 und zeigten damit sowohl schlechter als auch besser ernährte Larven im Vergleich zum Englischen Kanal. Trotz der höheren Anzahlen hungriger Larven im Nord-Ostsee-Kanal ist der generelle Ernährungszustand der untersuchten Population besser, wie aus der Verschiebung zu höheren RNA/DNA Verhältnissen deutlich wird.

**Vergleich: Nord-Ostsee-Kanal - Nördliche Nordsee**

Von den Heringslarven aus dem Nord-Ostsee-Kanal der Längengruppen 12-18 mm zeigten 10.3 % der Larven RNA/DNA Verhältnisse innerhalb des 2s-"Hungerbandes" (Abb. 49). In dieser Längengruppe wurden unter den Heringslarven aus dem Orkney/Shetland Gebiet keine hungrigen Individuen gefunden. Die Verteilung der relativen Häufigkeiten der RNA/DNA Verhältnisse von Larven aus dem Nord-Ostsee-Kanal war im Vergleich zur nördlichen Nordsee zu geringeren Werten verschoben und zeigte damit einen generell schlechteren Ernährungszustand.

In allen drei Untersuchungsgebieten zeigten die RNA/DNA Verhältnisse eine Zunahme mit der Länge der Larven. Sie ließen sich mit denen in Abb. 50 dargestellten Regressionsgeraden beschreiben.



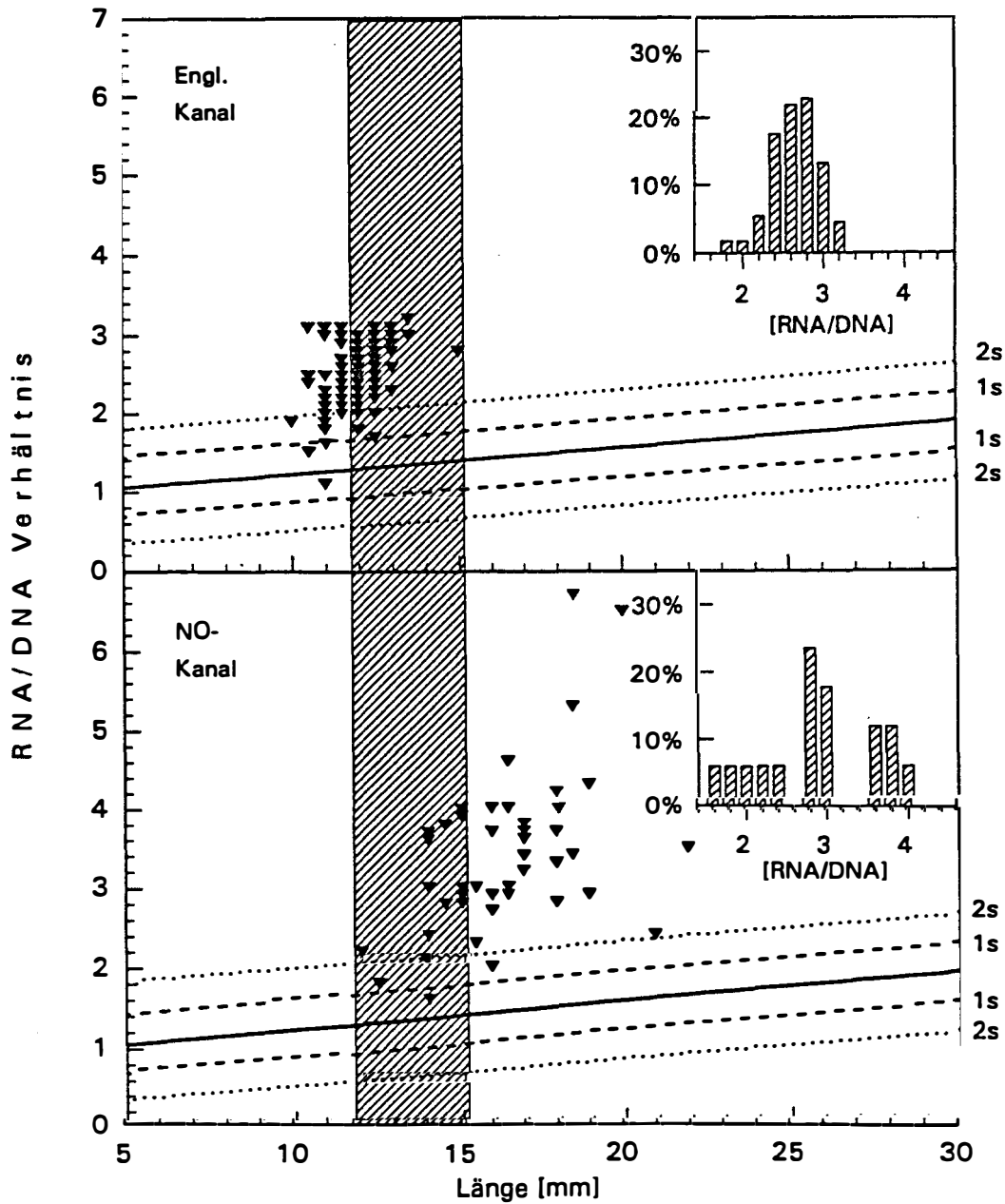


Abb. 48:

Vergleich der individuellen RNA/DNA Verhältnisse von Heringslarven aus dem Englischen Kanal und dem Nord-Ostsee-Kanal im Vergleich zum Labor- "Hungerband". Der schraffierte Teil zeigt die Längenbereiche, die für den Gebietsvergleich verwendet wurden und die Grundlage für die in der Graphik dargestellten RNA/DNA Häufigkeitsverteilungen lieferten.

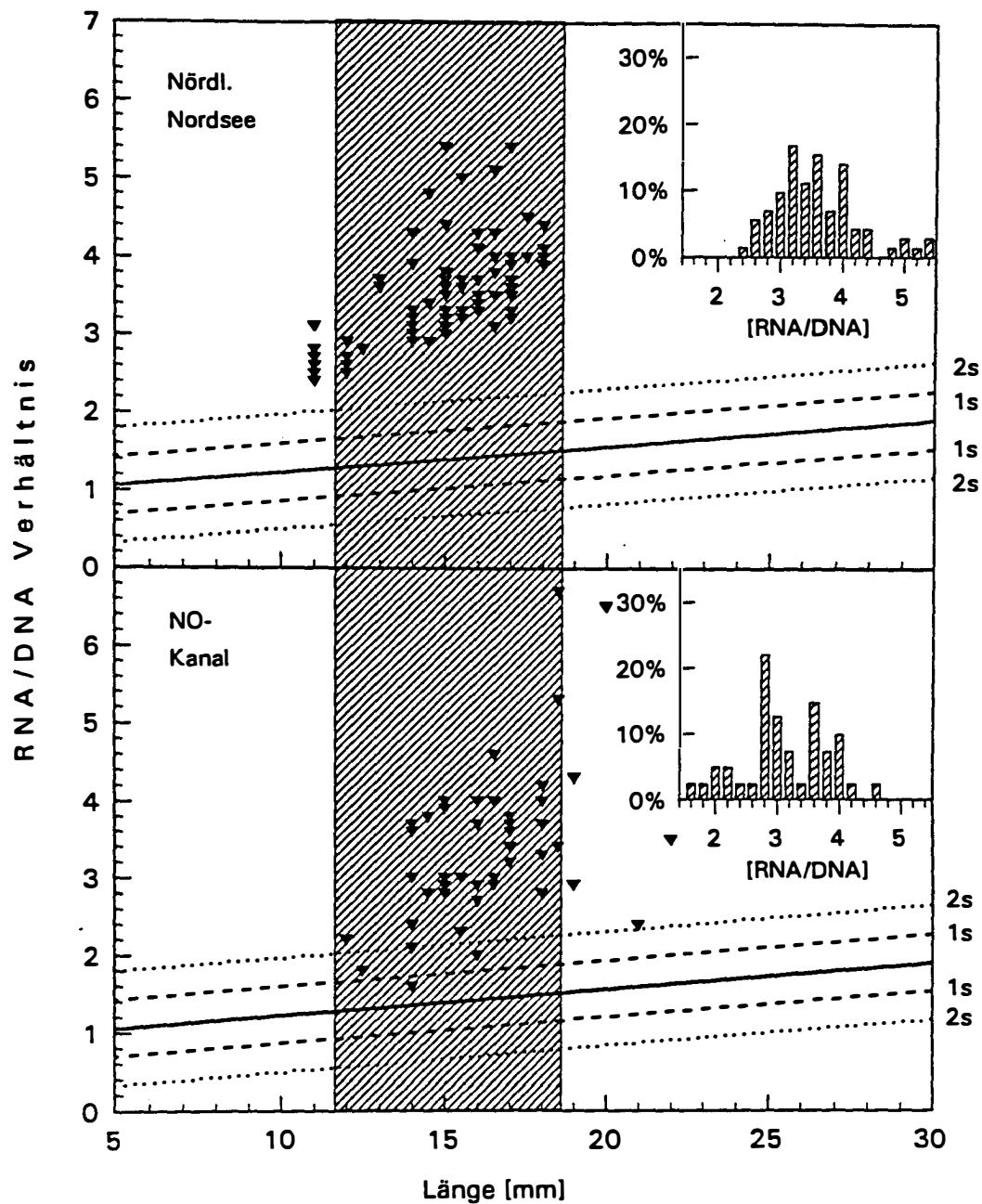


Abb. 49:

Vergleich der individuellen RNA/DNA Verhältnisse von Heringslarven aus der Nördlichen Nordsee und dem Nord-Ostsee-Kanal im Vergleich zum Labor- "Hungerband". Der schraffierte Teil zeigt die Längenbereiche, die für den Gebietsvergleich verwendet wurden und die Grundlage für die in der Graphik dargestellten RNA/DNA Häufigkeitsverteilungen lieferten.

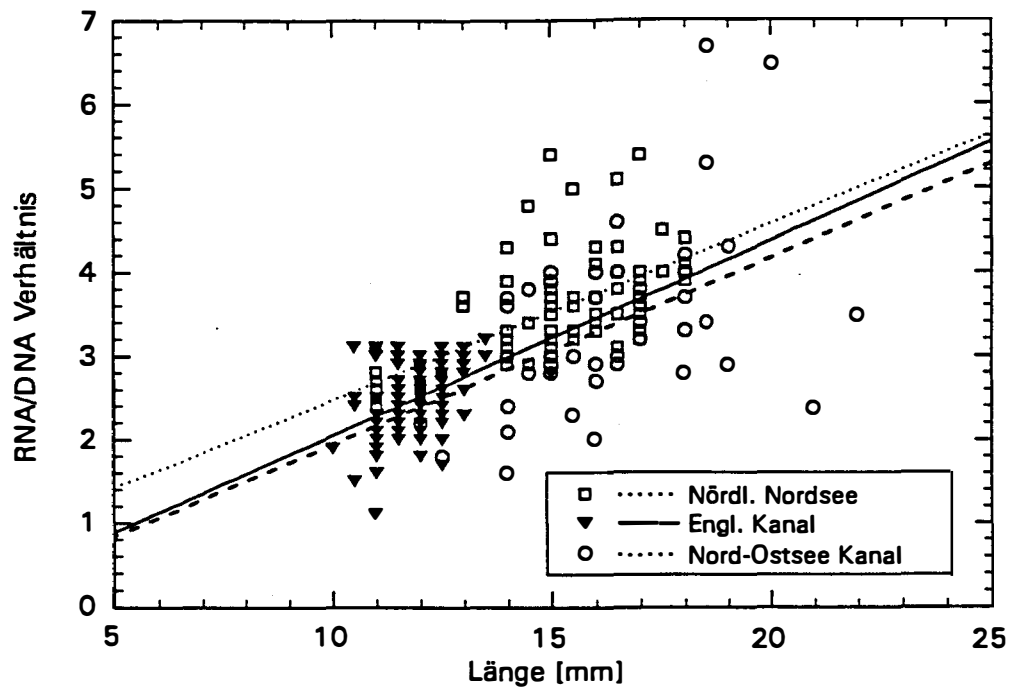


Abb. 50:

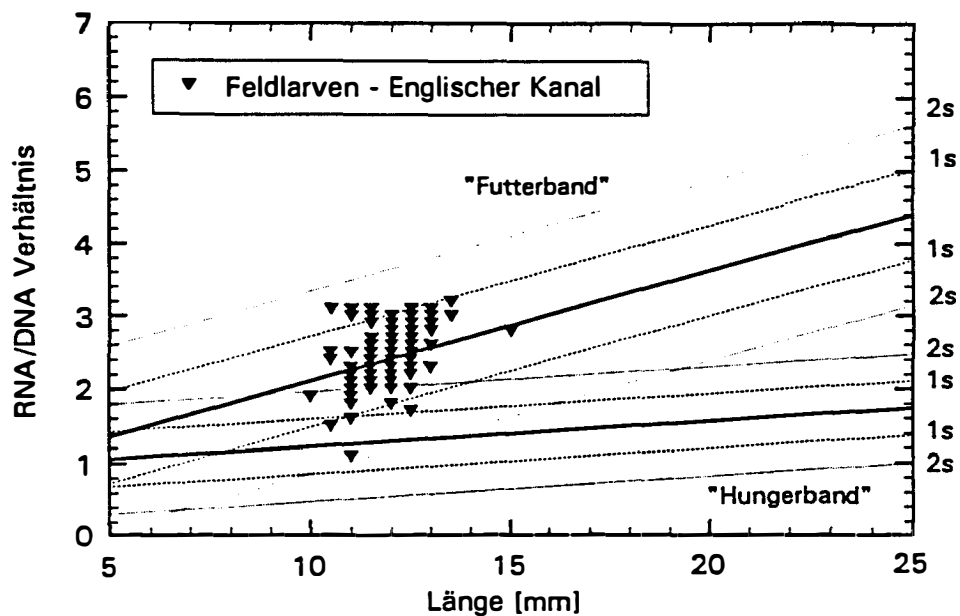
Beziehung zwischen RNA/DNA Verhältnis und Länge der Larven (individuelle Werte) aus dem Englischen Kanal, der nördlichen Nordsee und dem Nord-Ostsee-Kanal. Die eingezeichneten Linien entsprechen den an die Daten angepaßten Regressionsgeraden.

### 3.5.3 Beurteilung des Ernährungszustandes von Heringslarven anhand des "Futter"- und "Hungerbandes"

Die RNA/DNA Verhältnisse von Heringslarven aus dem Englischen Kanal, dem Nord-Ostsee-Kanal und der nördlichen Nordsee im Vergleich zu dem in Laborversuchen ermittelten "Futterband" und "6-9 Tage "Hungerband" sind in Abb. 51 - Abb. 53 dargestellt.

Die RNA/DNA Verhältnisse der Larven aus dem Englischen Kanal lagen alle im Bereich des "Futterbandes" und etwa gleichmäßig im oberen und unteren Standardabweichungsbereich verteilt. Demnach müßten anhand des "Futterbandes" alle Larven als gut ernährt bezeichnet werden. Basierend auf der Beurteilung anhand des "Hungerbandes" ließen sich aber 2.7 % der Larven dem 1s-Hungerbereich und 9.5 % der Larven dem 2s-Hungerbereich zuordnen (Abb. 51). Ähnlich waren die Ergebnisse für die Beurteilung der Larven aus dem Nord-Ostsee-Kanal. Anhand des

"Futterbandes" waren alle Larven gut ernährt. Basierend auf dem "Hungerband" wurden 2.1 % (1s) und 8.3 % (2s) als hungrig eingestuft werden (Abb. 52). Diese Unterschiede in der Beurteilung der Ernährungssituation der Larven sind auf die starken Überschneidungen zwischen dem in Labor gefundenen "Futterband" und "Hungerband" zurückzuführen, für die hauptsächlich die großen Anzahlen schlecht ernährter gefütterter Larven verantwortlich sind. Alle Heringslarven aus der nördlichen Nordsee zeigten RNA/DNA Verhältnisse im oberen Bereich des "Futterbandes" (Abb. 53) und wiesen damit im Vergleich zu den gefütterten Laborlarven einen im Mittel besseren Ernährungszustand auf. Im Überschneidungsbereich zwischen "Futter-" und "Hungerband" waren keine Larven zu finden, so daß davon ausgegangen werden kann, daß sich alle Larven in einem guten Ernährungszustand befanden.



**Abb. 51:**

RNA/DNA Verhältnisse von Heringslarven aus dem Englischen Kanal im Vergleich zu dem unter Laborbedingungen ermitteltem "Futter-" und "Hungerband". Dargestellt sind die an die Labordaten der "Futter-" und "6-9 Tage Hungergruppe" angepaßten Regressionsbeziehungen zwischen den individuellen RNA/DNA Verhältnissen und den jeweiligen Längen, sowie die zweiseitige einfache (1s) und zweifache (2s) Standardabweichung dieser Regressionsbeziehungen. Die individuell bestimmten RNA/DNA Verhältnisse der Feldlarven unter Berücksichtigung ihrer Längen sind dargestellt.

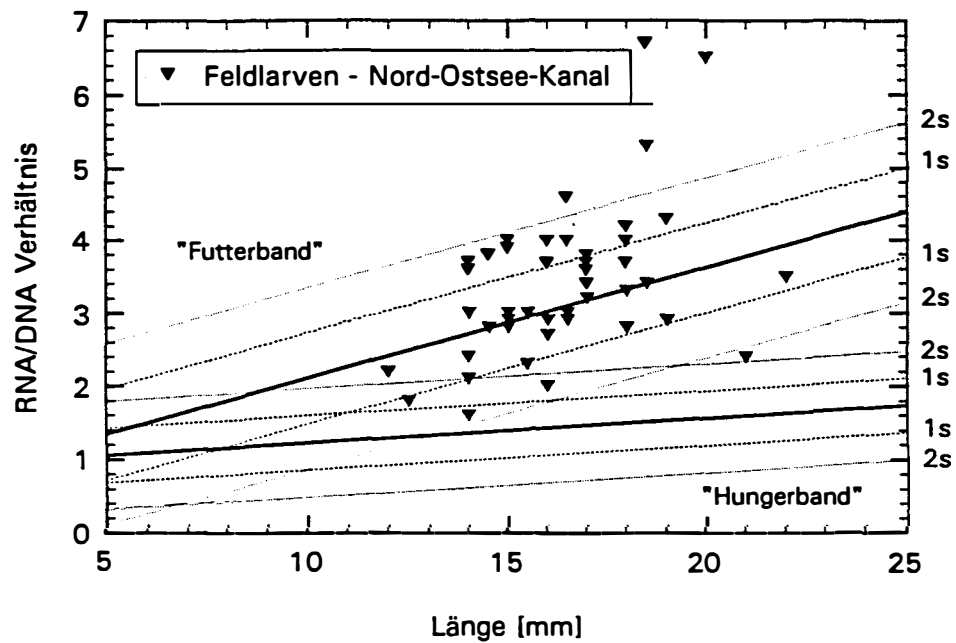


Abb. 52:

RNA/DNA Verhältnisse von Heringslarven aus dem Nord-Ostsee-Kanal im Vergleich zu dem unter Laborbedingungen ermitteltem "Futter-" und "Hungerband". Erklärungen siehe Abb. 51.

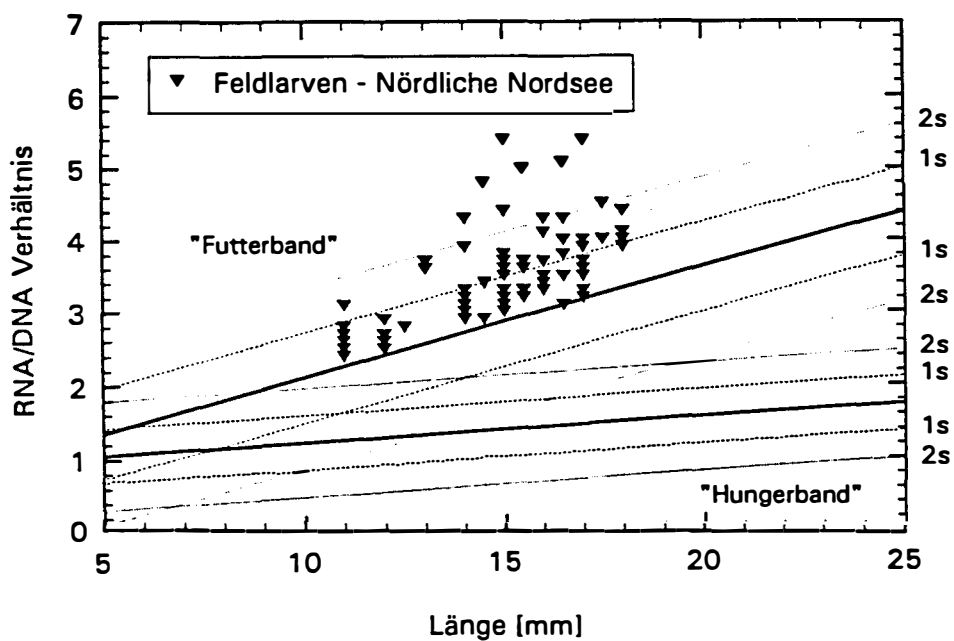


Abb. 53:

RNA/DNA Verhältnisse von Heringslarven aus der Nördlichen Nordsee im Vergleich zu dem unter Laborbedingungen ermitteltem "Futter-" und "Hungerband". Erklärungen siehe Abb. 51.

### 3.6 EIGNUNG DER LABORAUFZUCHTANLAGE

Die Eignung der Laboraufzuchtanlage wurde anhand der Reaktion von Heringslarven aus in situ- Fängen auf Futter- und Hungerzustände unter Laborbedingungen getestet. Heringslarven aus der Schlei wurden im Labor 8 Tage mit *Artemia* Nauplien (1/ml) und *Brachionus plicatilis* (5/ml) gefüttert. Nach 4 Tagen Fütterung im Labor zeigten die Larven im Mittel RNA/DNA Verhältnisse wie am Fangtag (Abb. 54). Nach 8 Tagen Fütterung zeigten die Larven ein höheres mittleres RNA/DNA Verhältnis, was zeigt, daß die Aufwuchsbedingungen zur Erhaltung bzw. Verbesserung des natürlichen Ernährungszustandes von Feldlarven geeignet waren. Der anschließende 3-tägige Futterentzug ergab eine Reduktion des RNA/DNA Verhältnisses auf einen Mittelwert von 1.8 (Reduzierung um 30 % im Vergleich zum 8. Tag) und lag damit im Bereich der prozentualen Abnahmen, die auch bei den oben gezeigten Laborhungerversuchen festgestellt worden waren.

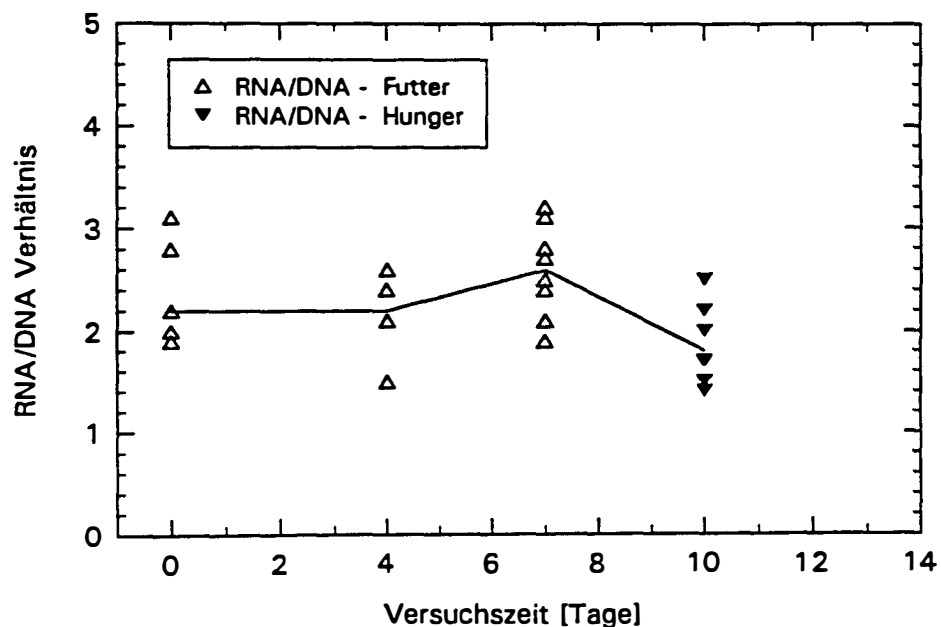
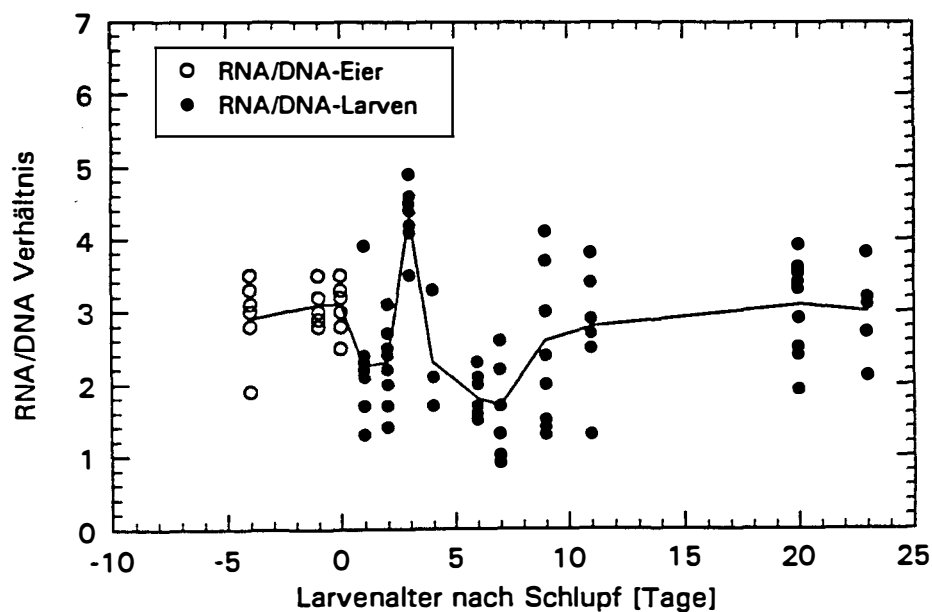


Abb. 54:

Heringslarven aus der Schlei: RNA/DNA Verhältnisse von lebend gefangenen Larven aus der Schlei, die im Labor gehältert wurden. Die Probennahme erfolgte am Tag "Null" (in situ-Fangtag), am 4. und 7. Futtertag und am 10. Tag nach 3 Tagen Futterentzug im Labor. Die eingezeichnete Linie verbindet die Mittelwerte.

Die Überprüfung der Laboraufzuchtbedingungen erfolgte außerdem durch einen Vergleich der RNA/DNA Verhältnisse von Heringseiern und der sich daraus entwickelnden Heringslarven. Dabei wurde davon ausgegangen, daß die RNA/DNA Verhältnisse der Eier einen guten Ernährungszustand wiedergeben sollten, um eine erfolgreiche Larvalentwicklung zu ermöglichen. Die RNA/DNA Gehalte von Heringseiern (1-2 Eier pro Bestimmung) zu drei Terminen kurz vor dem Schlupf und der Verlauf in der Entwicklung der RNA/DNA Quotienten von gefütterten Heringslarven bis zu einem Alter von 24 Tagen nach dem Schlupf wurden untersucht (Abb. 55). Die RNA/DNA-Gehalte der einzelnen Eier ergaben im Mittel einen Quotienten von 3.0 und stimmten gut mit dem von BUCKLEY (1981) an Winterflundern ermittelten Wert von 3.2 überein. Die RNA/DNA Verhältnisse der einzelnen Heringslarven streuten in einem Bereich von 1.3-4.9 und nahmen im Mittel bis zu einem Alter von drei Tagen zu, gefolgt von einer Abnahme mit einer anschließenden Stabilisierung ab dem 11. Tag bei einem Wert von etwa 3.0, der den in den Eiern gefundenen Verhältnissen entsprach.



**Abb. 55:**

Individuelle RNA/DNA Verhältnisse von Heringseiern und gefütterten Heringslarven. Die eingezeichneten Linien verbinden die Mittelwerte der jeweiligen Altersgruppen. "0" kennzeichnet die Eier am Tage des Schlupfes (Heringslarvenaufzucht 1986).

## 4. DISKUSSION

### 4.1. ANALYTISCHE METHODEN

Die Entwicklung einer hochempfindlichen, gut reproduzierbaren und einfachen Methode zur quantitativen simultanen RNA- und DNA-Bestimmung aus Ganzkörperhomogenaten von Fischlarven stand im Mittelpunkt der analytischen Arbeiten. Gefordert war dabei eine etwa 10- fache Empfindlichkeitssteigerung verglichen mit den bisher verwendeten Nukleinsäure- Nachweismethoden (BUCKLEY 1979, CLEMMESSEN 1985), um den Nukleinsäuregehalt einzelner Fischlarven bestimmen zu können.

Im Vergleich zum konventionellen UV- Absorptionstest (BUCKLEY 1979) mit einer minimalen Nachweisgrenze von 1 - 2  $\mu\text{g}$  DNA/ml oder RNA/ml, entsprechend einer Minimalmenge an Larvenmaterial von 0.8 mg Trockengewicht, ermöglicht die Verwendung von nukleinsäurespezifischen Fluoreszenzfarbstoffen (Ethidiumbromid, Bisbenzimidazol) den Nachweis von 0.1  $\mu\text{g}$  DNA/ml oder RNA/ml. Basierend auf den Arbeiten von BEERS & WITTLIFF (1975), BOER (1975), KARSTEN & WOLLENBERGER (1972, 1977), LePECQ & PAOLETTI (1966) und PRASAD et al. (1972), die den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid zur Bestimmung von DNA und RNA in Zell- und Gewebhomogenaten von Ratten verwendeten, wurden Versuche zur Bestimmung der Nukleinsäuregehalte aus Fischlarvengewebe mit diesem Farbstoff unternommen.

Die in den oben genannten Arbeiten angegebenen Nukleinsäureaufschluß- Prozeduren sind sehr einfach gehalten und arbeiten mit stark verunreinigten Nukleinsäurelösungen. Dies führte in eigenen Untersuchungen zu starken Schwankungen bei den Messungen und zu großen Unterschieden bei der quantitativen DNA- Bestimmung mit zwei verschiedenen Nachweismethoden (DNA- Bestimmung mit Bisbenzimidazol und DNA- Nachweis mit Ethidiumbromid nach RNase Behandlung). Daher gab es Anlaß zu der Vermutung, daß die Anlagerung der Fluoreszenzfarbstoffe an die DNA nur partiell erfolgen kann und durch die Präsenz von Nukleoproteinen gestört wird. Die Verwendung von Heparin zur Dissoziation des Nukleoproteins, wie von KARSTEN & WOLLENBERGER (1977) beschrieben, scheint nicht ausreichend zu sein. Bei dem Versuch, Nukleinsäuren aus mit Gewebesubstanzen kontaminierten grob gereinigten



Lösungen zu bestimmen, kam es zu Problemen hinsichtlich der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit, für die möglicherweise "Quenching"- Effekte verantwortlich waren. Beim "Quenching" handelt es sich um eine Störung des Fluoreszenzsignals, die auf eine Interaktion zwischen Fluorophor und einer anderen im System vorkommenden Substanz, wie Membranbausteine und Nukleoproteine, zurückgeht und sich nicht quantifizieren läßt (GUILTBAULT 1973). Daher war es im Gegensatz zu den oben genannten Verfahren erforderlich, Reinigungsschritte in das Aufschlußverfahren einzubauen, um diese störenden Substanzen zu eliminieren.

Probleme bei der Fluoreszenzbestimmung von Nukleinsäuren in Röhrenwürmern (*Ridgeia spp.*) bedingt durch die Eigenfluoreszenz von Gewebeproteinen und Blutkomponenten wurden von DeBEVOISE & TAGHON (1988) beschrieben. Durch Einfügen der Hydroxylapatit- Säulenchromatographie zur Reinigung der Nukleinsäuren, konnten die Störungen bei den Fluoreszenzmessungen beseitigt werden. Dieses Reinigungsverfahren ist jedoch sehr zeitintensiv und für große Probenmengen nicht geeignet. Die Verwendung von Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol Waschschritten, sowie SDS- und Proteinase-K Behandlung, wie in dieser Studie beschrieben (siehe 2.1.2), führte, wie gelelektrophoretisch gezeigt werden konnte, zu hochmolekularen gereinigten Nukleinsäurelösungen, und war einfach durchzuführen. Auch LIZARDI & ENGELBERG (1979), die RNA aus Pankreasgewebe isolierten, und CHAN et al. (1988), die humane Gewebeproben untersuchten, konnten mittels Gelelektrophorese zeigen, daß die strukturelle Integrität von RNA durch Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol- Behandlungen nicht angegriffen wird. Erste Anwendungen der in 2.1.2.2 beschriebenen hochempfindlichen Nukleinsäurenachweismethodik zeigten die Eignung des Verfahrens zur Beurteilung des Ernährungszustandes und Wachstums von einzelnen Fischlarven (CLEMMESSEN 1988, 1989; HOVENHAMP 1989).

Um den Umfang des mit der erwähnten Methode zu bearbeitenden Probenmaterials erhöhen zu können, wurde das Aufschluß- und Meßverfahren reduziert. Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wurde die störanfällige DNA-Bisbenzimidazol Meßtechnik durch die RNase-EB Methode zur DNA- Bestimmung ersetzt. Die überarbeitete Methodik führte zu einer Verdopplung des Probendurchsatzes bei verbesserter Reproduzierbarkeit. Dies wurde hauptsächlich durch eine Verringerung der Anzahlen der benötigten Reinigungsschritte und den Einsatz der Schwingmühle zum Homogenisieren der Fischlarven ermöglicht. Die Verringerung der nötigen Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol Reinigungsschritte in der überarbeiteten Methodik ergab reproduzierbare Ergebnisse (Variationskoeffizienten von 4-10 %) und führte im Vergleich zu der ersten

Methode zu einer höheren Nukleinsäureausbeute aus dem Fischlarvengewebe, da sowohl ein besserer Zellaufschluß durch Verwendung einer Zelmühle als auch geringere Nukleinsäureverluste durch die reduzierte Anzahl von durchzuführenden Phasentrennungen gegeben waren. Die angegebene Zahl der Reinigungsschritte ist für Heringslarven der Größengruppe "frischgeschlüpft" (ca. 6 mm) bis zu einer Größe von etwa 15 mm SL angepaßt. Für die Nukleinsäureanalyse größerer Larven muß ein weiterer Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol Reinigungsschritt eingesetzt werden, um eine zu hohe Proteinkontamination der Nukleinsäurelösung zu verhindern.

Neben den Problemen, die durch "Quenching" entstanden, gab es aufgrund von Hinweisen aus der Literatur (CLARKE et. al. 1989) und eigenen Beobachtungen Anzeichen für Probleme bei der DNA-Bisbenzimidazol Bestimmung. Daher wurde dieses Meßverfahren überprüft. Vor der Fluoreszenzmessung der Nukleinsäuren mittels der Fluoreszenzfarbstoffe wurde die Eigenfluoreszenz der extrahierten Homogenate ohne Fluoreszenzfarbstoff bestimmt und später von der Gesamtfluoreszenz subtrahiert. Im Falle der EB- Messung lag die Proben- Eigenfluoreszenz bei 1-4 % relativ zur Gesamtfluoreszenz und konnte vernachlässigt werden. Die Eigenfluoreszenz der Proben bei Bisbenzimidazol Messungen erreichte jedoch zum Teil Werte von 40 % relativ zur Gesamtfluoreszenz und schwankte stark. Grund dafür könnte die auch gelelektrophoretisch nachweisbare fluoreszierende Hintergrund- "Schmierbande" sein, die einen Hinweis auf Kontaminationen in den Nukleinsäurelösungen gibt. Es ist anzunehmen, daß diese Kontaminationen zu Problemen bei der DNA-Bisbenzimidazol Bestimmung führten. BRUNK et al. (1979) und LABARCA & PAIGEN (1980) beschrieben, daß nicht entfernte chromosomale Proteine die Anlagerung von Bisbenzimidazol an die DNA limitieren können. Im Vergleich dazu fanden CESARONE et al. (1979) für die DNA-Bisbenzimidazol Bestimmung sehr gute Reproduzierbarkeit zwischen den einzelnen Bestimmungen. Dies mag darauf zurückzuführen sein, daß sie mit Zellkulturen und stark gereinigten DNA Lösungen arbeiteten, bei denen der Anteil von fluoreszenz- störenden Substanzen sehr gering war. Im Falle der RNA-EB, DNA-EB Bestimmungen schienen diese Verunreinigungen keine Probleme zu verursachen. Der Nukleinsäure-EB Komplex war stabil und ergab gut reproduzierbare Ergebnisse. Weitere Ursachen für die Probleme bei der DNA-Bisbenzimidazol Messung können auch darin begründet sein, daß in störanfälligeren Wellenlängenbereichen gemessen werden muß und Bisbenzimidazol an den Küvetten adsorbiert. Sie mußten deshalb nach jeder Messung sehr gründlich gereinigt werden, um Fehler bei der fluorimetrischen Messung zu vermeiden. Es scheint daher ratsam, den DNA-Bisbenzimidazol Nachweis nur für sehr gut gereinigte DNA- Lösungen zu verwenden. Der Einfluß gewebeeigener

Störsubstanzen muß weiter untersucht werden, wenn der routinemäßige Einsatz von Bisbenzimidazol geplant ist. Auch Versuche mit einem anderen DNA- spezifischen Farbstoff DAPI (*4, 6-diamidino-2-phenylindole 2HCl*; KAPUSCINSKI & SKOCZYLAS 1977, RUSSELL et al. 1975) zeigten dieselbe Problematik.

Ersatzweise scheint es geeigneter, die DNA- Bestimmung mit EB nach selektivem RNA- Abbau durchzuführen. Da EB sowohl mit RNA als auch mit DNA reagiert, ist der getrennte Nachweis der Nukleinsäuren nur möglich, wenn eine der beiden vorher selektiv zerstört wird. Es stellte sich heraus, daß der enzymatische Abbau von RNA weitaus besser und reproduzierbarer verläuft als der DNA Abbau durch DNase. Im Gegensatz zu DNase kann RNase in einer Vielzahl von Pufferlösungen in einem weiten pH- Bereich eingesetzt werden, ohne seine Aktivität zu verlieren. Das erklärt auch den vielseitigen Einsatz von RNase zum quantitativen Abbau von RNA (BENTLE et al. 1981, DeBEVOISE & TAGHON 1988, KARSTEN & WOLLENBERGER 1972, 1977, ROBINSON & WARE 1988). Basierend auf den hier gezeigten Ergebnissen scheint die gewählte RNase- Konzentration in einigen der Studien recht hoch gewählt, so daß ein Einfluß auf die DNA nicht ausgeschlossen werden kann, da kommerziell erhältliche RNase Präparate im allgemeinen mit geringen DNase Nebenaktivitäten verunreinigt sind.

Die aus den "Ausbeuteversuchen" für RNA und DNA in dieser Arbeit errechneten Wiederfindungsraten lagen nahezu bei 100 % und verdeutlichen trotz eingebauter Reinigungsschritte den schonenden und quantitativen Aufschluß für die beiden Nukleinsäurearten. Die etwas geringeren Wiederfindungsraten für RNA deuten darauf hin, daß RNA wegen seiner kleineren Molekülgröße leichter in der Reinigungsprozedur verloren gehen kann. Auch DAGG & LITTLEPAGE (1972) ermittelten Wiederfindungsraten von 97-99 % für DNA und 92-102 % für RNA. PRASAD et al. (1972) bestimmten die Wiederfindungsraten von RNA und DNA nach dem von LePECQ & PAOLETTI (1966) beschriebenen Verfahren, das ohne Reinigungsschritte auskommt. Es ergaben sich Wiederfindungsraten für DNA von  $101 \% \pm 8 \%$  und für RNA von  $98 \% \pm 8 \%$ , die mit den hier ermittelten vergleichbar sind, so daß davon ausgegangen werden kann, daß das Einfügen von Reinigungsschritten zu keinem bedeutsamen Verlust an Nukleinsäuren führt.

Trotz erheblicher Empfindlichkeitssteigerung bei Verwendung eines fluorimetrischen Nachweisverfahrens im Vergleich zur Spektrophotometrie war es wegen der geringen Masse der einzelnen Larven erforderlich, die gesamte Larve auf ihren RNA- und

DNA- Gehalt zu untersuchen. Untersuchungen von HOULIHAN et al. (1988) zeigten, daß das Muskelgewebe im Vergleich zu anderen Gewebetypen am empfindlichsten auf Verhungern reagiert. So zeigten besonders Leber, Gehirn und Kiemen, deren Funktion für das Überleben des Organismus von größter Bedeutung ist, keine Reduzierung der Proteinbiosynthese, sondern hielten unabhängig vom Fütterungszustand die Proteinbiosynthese- Aktivität gefütterter Tiere (HENSHAW et al. 1971, HOULIHAN et al. 1988, 1989, LOUGHNA & GOLDSPIK 1984). Bestimmte Arten von m-RNAs, die für lebenswichtige Proteine kodieren, werden unter Hungerzuständen nicht abgebaut, um bei Verbesserung der Ernährungssituation sofort aktiviert werden zu können und die nötigen Proteine wieder aufzubauen (VON DER DECKEN 1989). Da aber das Muskelgewebe die größte Gewebemasse im Körper ausmacht (40-60 % des Gesamt-Lebendgewichtes, HOULIHAN et al. 1988) kann deshalb durch die Bestimmung der RNA/DNA Gehalte der Ganzkörperhomogenate eine Veränderung in der Ernährungssituation von Fischlarven erfaßt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die hier entwickelte Methode für den quantitativen Nachweis von RNA- und DNA- Gehalten aus Ganzkörperhomogenaten von individuellen Fischlarven geeignet ist und auch an Bord von Forschungsschiffen durchgeführt werden kann.

#### **4.2. RNA/DNA VERHÄLTNISSE VON FISCHLARVEN AUS LABOR-AUFZUCHTEN**

Ziel der Laborexperimente war es, die Eignung des RNA/DNA Verhältnisses zur Beurteilung des Ernährungszustandes individueller Fischlarven zu ermitteln und den Anwendungsbereich für die Begutachtung von Fischlarven aus Felduntersuchungen festzulegen. Experimente zur Kalibrierung der RNA/DNA Verhältnisse wurden durchgeführt, um feststellen zu können, ob eine Larve zum Zeitpunkt des Fanges gut ernährt war oder eine Hungerzeit durchlebt hatte. Dazu wurden Larven im Labor unterschiedlich langen Hungerzeiten ausgesetzt. Der Einfluß der in situ wirkenden Größen, Futterdichte, Temperatur und Tagesperiodik auf das RNA/DNA Verhältnis wurde überprüft.

### RNA/DNA Verhältnisse gefütterter Larven

Unter "gefütterten Larven" wurden in dieser Arbeit Fischlarven definiert, die einmal täglich mit *Brachionus plicatilis* und *Artemia* Nauplien in einer Dichte gefüttert wurden, die unter Laborbedingungen zu hohen Wachstums- und Überlebensraten führte (WERNER & BLAXTER 1980, 1981). Die RNA/DNA Verhältnisse dieser Larven wurden unter Berücksichtigung der Varianz zwischen den einzelnen Individuen und in Abhängigkeit von den Larvenlängen in einem sogenannten "Futterband" dargestellt (Definition siehe 3.2.3).

Durch Verwendung einer Analysemethode, die die individuelle Bestimmung des Zustandes von Fischlarven ermöglicht, konnte erstmals die Variabilität in einer unter Laborbedingungen theoretisch gleichbehandelten Versuchsgruppe ermittelt werden. Die Ergebnisse der RNA/DNA Bestimmungen an gefütterten Larven zeigten eine große Streuung zwischen den Individuen und trotz des hohen Futterangebotes ließen sich in allen Altersgruppen Larven mit RNA/DNA Verhältnissen finden, die charakteristisch für hungernde Individuen sind. Das führte zu Überschneidungen zwischen Futter- und Hungergruppe, so daß eine eindeutige Trennung beider Gruppen nur bei extrem gut bzw. extrem schlecht ernährten Larven möglich war (siehe Abb. 22). Bei Heringslarven bis zu einem Alter von 10 Tagen nach dem Schlupf war anhand der RNA/DNA Verhältnisse keine Trennung in Futter- und Hungergruppe möglich. Die RNA/DNA Verhältnisse nahmen sowohl bei der Futtergruppe als auch bei der Hungergruppe bis zu einem Alter von drei Tagen zu und zeigten dann in beiden Gruppen trotz reichlich vorhandenen Futters eine deutliche Reduktion der RNA/DNA Verhältnisse. Die deutliche Zu- und Abnahme der RNA/DNA Verhältnisse in den ersten Tagen nach dem Schlupf zeigte sich auch bei Untersuchungen anderer Autoren (BUCKLEY 1980, CLEMMESEN 1987, RAAE et al. 1988). Sie läßt sich vermutlich auf eine starke Mobilisierung der Dottervorräte gleich nach dem Schlupf und eine im Anschluß geringere Stoffwechselaktivität gegen Ende der Dottersackphase zurückführen.

Als Gründe, warum Fischlarven trotz reichlich vorhandenem Futter hungern, kommen Probleme bei der Umstellung von interner (Dottersack) auf externe Ernährung, angeborene Defekte, individuelle Unzulänglichkeiten und Futterkonkurrenz als mögliche Erklärungen für die gefütterten und trotzdem schlecht ernährten Larven in Betracht. Daß es sich hierbei nicht um einen Laboraufzuchteffekt handelt, sondern auch unter in situ Bedingungen aufzutreten scheint, zeigten Untersuchungen von ROBINSON & WARE (1988), die bei Heringslarven in See stark verringerte RNA/DNA Verhältnisse

zur Zeit der Umstellung von interner auf externe Ernährung feststellten. Es ist denkbar, daß die für die Ernährungsumstellung nötigen physiologischen Anpassungen wie das Öffnen von Maul und Ösophagus, Bildung von Leber, Galle und Pankreas (GOVONI 1980, GOVONI et al. 1986, O'CONNELL 1981) und die Entwicklung der proteolytischen Verdauungsenzyme (DABROWSKI 1984, UEBERSCHÄR 1985) aufgrund von angeborenen genetischen Defekten nicht erfolgen oder, bedingt durch individuelle Unzulänglichkeiten, erst zeitlich verzögert auftreten. Auch die Voraussetzungen für die Resorption der Nahrung durch den Darm müssen geschaffen werden. Die Fähigkeit des Darms zur Aufnahme von Proteinmakromolekülen entwickelt sich erst langsam und ist zum Zeitpunkt der ersten Futteraufnahme wahrscheinlich noch nicht voll ausgebildet (DEPLANO et al. 1991). Larven, bei denen diese Entwicklungen zeitlich verzögert auftreten, könnten deshalb verhungern.

Auch Probleme bei der Ausbildung des Bewegungsapparates, der für ein effektives Beutefangen erforderlich ist, könnten für das Hungern der Larven trotz vorhandenen Futters verantwortlich sein. Während der ersten Tage beträgt die Fangeffizienz von Heringslarven nur 2-6 % (BLAXTER & STAINES 1971). CHECKLEY (1982) zeigte, daß der Anteil von Heringslarven, die in Laborexperimenten Futter aufgenommen hatten, im Alter von vier Tagen nur bei 4 % lag. KVENSETH & OIESTAD (1984) beobachteten einen 100 %igen Fangerfolg bei Dorschlarven ab 10 Tage nach dem Schlupf. ROSENTHAL (1969) konnte zeigen, daß sich die Schnappgeschwindigkeit von Heringslarven mit der Zunahme der Larvenlänge deutlich erhöhte. Erst wenn eine Stabilisierung der physiologischen Situation der Larven erfolgt ist, verbunden mit einer Erhöhung der Fangeffizienz, können Larven, denen Futter zur Verfügung steht, ihren Ernährungszustand verbessern und anhand des RNA/DNA Verhältnisses von hungernden Larven unterschieden werden. Die oben genannte Grenze des 10. Tages kann hierfür aber kein absolutes Maß sein, da die genannten physiologischen Umstellungen von der Wassertemperatur abhängen.

Auch andere Autoren liefern Hinweise, daß es sich bei der fehlenden Trennschärfe zwischen jungen hungernden und gefütterten Fischlarven nicht um ein analytisch-methodisches Problem, sondern um ein natürlich auftretendes Phänomen handelt, das durch die Nahrungsumstellung bedingt ist. Histologische Untersuchungen von O'CONNELL (1976) zur Bestimmung der Ernährungslage an Anchovy- Larven und die Analyse der proteolytischen Verdauungsenzym- Aktivitäten von Herings- und Steinbuttlarven (PEDERSEN et al. 1987, 1990, UEBERSCHÄR 1985) sowie die Bestimmung der Fettsäuren von *Morone saxatilis* (MARTIN et al. 1984) ließen auch keine Unterscheidung zwischen gefütterten und hungernden Larven in dieser frühen

Lebensphase zu. Daher wird inzwischen vermutet, daß es sich bei der Reduktion der Werte der genannten Indikatoren um eine genetisch vorprogrammierte Entwicklung handelt, die durch den Wechsel von exogener auf endogene Ernährung bedingt ist (PEDERSEN et al. 1990). Auch in späteren Phasen der Larvalentwicklung bis zur Metamorphose haben Fischlarven erhebliche physiologische Umstellungen zu bewältigen (BLAXTER 1988), die zu einer Änderung in der metabolischen Aktivität führen und damit auch die RNA/DNA Verhältnisse beeinflussen können. Der wiederholte deutliche Abfall in den RNA/DNA Verhältnissen im Laufe der Larvalentwicklung in den hier gezeigten Laboraufzuchtexperimenten in Alter von etwa 20, 30 und 45 Tagen (Abb. 20, Abb. 21) und in früheren Aufzuchten (CLEMMESSEN 1985, 1987) deutet auf physiologische Umstellungen hin. Auch FUKUDA et al. (1986) und ROBINSON & WARE (1988) fanden bei Heringslarven eine Reduktion der RNA/DNA Verhältnisse beim Wechsel von Entwicklungsphasen. Da diese Entwicklungen nicht bei allen Larven zeitgleich erfolgen, wirken sich diese Unterschiede auch auf die RNA/DNA Verhältnisse aus und führen zu den im Labor beobachteten großen Streuungen zwischen den Individuen.

Neben den physiologischen Umstellungen während der Larval- Entwicklung, die zu einem schlechten Zustand der Fischlarven führen können, bewirken unterschiedliche Startbedingungen der Larven nach dem Schlupf deutliche individuelle Unterschiede, die über die Bestimmung der RNA/DNA Verhältnissen erfaßt werden können. HEMPEL & BLAXTER (1967) zeigten, daß größere Weibchen größere Eier produzieren und die Eigröße die Larvalgröße beeinflusst (BLAXTER & HEMPEL 1963, KNUDSEN & TILSETH 1985). Damit können Unterschiede im Elternbestand zu deutlichen Unterschieden bei den Larven und einem auffälligen Auseinanderwachsen mit zunehmendem Larvenalter führen (BLAXTER 1988). MILLER et al. (1988) stellten eine Größenabhängigkeit von Fischlarven in Bezug auf Aktivität, Räuberrisiko und Überlebenswahrscheinlichkeit fest. Die kleineren Larven waren weniger aktiv, schwammen langsamer und waren im Vergleich zu ihren größeren Altersgenossen weniger effektiv im Erbeuten von Futterorganismen und damit nicht konkurrenzfähig und beim Kampf um vorhandenes Futter unterlegen. Sie wurden in anderen Untersuchungen als "Looser-Larven" definiert ( HAKANSON 1989 b, WESTERMAN & HOLT 1988).

Durch die individuelle Analyse der RNA- und DNA- Gehalte von Fischlarven konnte erstmals die Längenabhängigkeit der RNA/DNA Verhältnisse sowohl bei den Herings- und Steinbuttlarven aus der Laboraufzucht als auch bei den Heringslarven aus Feld-

untersuchungen festgestellt werden. Larven mit gleichem Ernährungszustand zeigten unter Laborbedingungen eine Zunahme der RNA/DNA Verhältnisse mit der Larvenlänge. Basierend auf theoretischen Überlegungen war davon ausgegangen worden, daß das RNA/DNA Verhältnis längenunabhängig zur Zustandsbegutachtung verwendet werden kann, da durch die Betrachtung des DNA- Gehaltes, der mit der Länge korreliert ist, die Länge automatisch mitbetrachtet wird. Pro Zelle, mit konstanter DNA-Menge, sollte eine gleichbleibende Menge RNA zur Verfügung stehen, die einen geregelten Metabolismus der Larve gewährleistet. RNA/DNA Verhältnisse von gefütterten Larven sollten sich also unabhängig von der Larvenlänge auf einen nahezu konstanten Wert einstellen. Die Laborergebnisse zeigten aber eine Zunahme der RNA/DNA Verhältnisse gefütterter Larven mit der Larvenlänge. Eine Stabilisierung der RNA/DNA Verhältnisse scheint erst möglich zu sein, wenn die physiologischen Umstellungen der Larven erfolgt sind und eine metabolische Balance des Organismus erreicht ist. So zeigten Untersuchungen von FUKUDA et al. (1986) an Pazifischen Heringslarven, daß erst bei einer Länge von 30 mm der prozentuale Anteil von Glycogen, Phospholipiden und Proteinen am Trockengewicht einen konstanten Wert erreichte. Die höchsten RNA/DNA Verhältnisse von Fischlarven aus Labor- und Felduntersuchungen lagen bei Werten von 7-8 (BUCKLEY 1985, FUKUDA et al. 1986, ROBINSON & WARE 1988) und könnten ein Hinweis auf die maximal erreichbare Proteinwachstumsrate sein.

Durch Verwendung von Nachweismethoden, die die Begutachtung des Ernährungszustandes einzelner Larven ermöglichen, haben inzwischen auch andere Autoren eine Längenabhängigkeit ihres Indikators festgestellt. ROBINSON & WARE (1988) beschrieben eine positive Korrelation zwischen Standardlänge und RNA/DNA Verhältnis bei pazifischen Heringslarven. Eine deutliche Längenabhängigkeit bei der Bestimmung von Speicherlipiden zeigten auch FRASER (1989) sowie COOMBS & HAKANSON (1991), die eine Zunahme der Triacylglyceride mit zunehmender Larvenlänge beobachteten. Es ist daher erforderlich, bei der individuellen Zustandsbegutachtung die jeweilige Larvenlänge mit zu betrachten, um eine möglichst genaue Zuordnung zu gewährleisten.

Ein Vergleich der hier gefundenen Ergebnisse für gefütterte Larven mit denen anderer Autoren ist schwierig, da andere Nukleinsäure- Nachweismethoden verwendet und gepoolte Larvenproben untersucht wurden. Schon bei den beiden in dieser Studie entwickelten Analysemethoden ergaben sich unterschiedliche RNA/DNA Verhältnisse, die zum Vergleich mit einem Korrekturfaktor versehen werden mußten. Versuche, die von



BUCKLEY (1979) beschriebene Nukleinsäurenachweismethode mit dem in dieser Studie entwickelten Verfahren (CLEMMESSEN 1990) zu interkalibrieren, ergaben trotz unterschiedlicher methodischer Ansätze jedoch im Mittel vergleichbare RNA/DNA Verhältnisse, so daß auf einen Korrekturfaktor verzichtet werden konnte. Weiterhin wurde der Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren durch Verwendung unterschiedlicher Futterdichten, die die RNA/DNA Verhältnisse beeinflussen, erschwert. Der Mittelwert, der individuell bestimmten RNA/DNA Verhältnisse aller Altersgruppen aus dieser Studie, wurde mit den in der Literatur beschriebenen mittleren RNA/DNA Verhältnissen von gepoolten Proben verglichen. Es ergaben sich gute Übereinstimmungen mit den Untersuchungen von BUCKLEY (1984), der an Heringslarven ein mittleres RNA/DNA Verhältnis von 2.90 im Vergleich zu einem mittleren Wert von 2.80 für gefütterte Heringslarven in dieser Arbeit fand. Ergebnisse über Nukleinsäuregehalte und RNA/DNA Verhältnisse von Steinbuttlarven liegen nur von CLEMMESSEN (1987) an gepoolten Proben vor und ergaben ein mittleres RNA/DNA Verhältnis von 2.6 im Vergleich zu 2.7 in der hier vorliegenden Untersuchung. RNA/DNA Verhältnisse um 3.0 beschrieben WRIGHT & MARTIN (1985) für gefütterte *Morone saxatilis*. Die von BUCKLEY (1981,1984) gemessenen RNA/DNA Verhältnisse an gefütterten Winterflundern (*Pseudopleuronectes americanus*) lagen mit 3.80-4.90 höher als die Werte der hier untersuchten Herings- und Steinbuttlarven.

#### RNA/DNA Verhältnisse hungernder Larven

Signifikante Unterschiede zwischen den RNA/DNA Verhältnissen von gefütterten und hungernden Fischlarven konnten erst nach 3-4 Tagen Futterentzug festgestellt werden. Eine Verlängerung der Hungerzeit auf 6-9 Tage führte zu einer weiteren Reduktion der RNA/DNA Verhältnisse. Kürzere Hungerintervalle ließen mit der verwendeten Meßtechnik keine signifikante Trennung zwischen Hunger- und Futtergruppe zu, da nur eine Änderung im Ribosomengehalt (und damit der RNA- Menge) aber nicht in der Aktivität der Ribosomen (RNA- Menge bleibt konstant) erfaßt werden kann. Die Ribosomen können zwar durch Aktivitätsänderungen bereits im Bereich von Stunden auf Hunger reagieren, eine Reduzierung der Ribosomenzahlen und damit der RNA- Menge aber erfolgt erst nach längeren Hungerzeiten im Bereich von Tagen (HENSHAW et al. 1971, LIED et al. 1982, MILLWARD et al. 1976). Mit Verlängerung der Hungerzeit nahmen die RNA/DNA Verhältnisse weiter ab, dabei zeigten sie eine lineare Abnahme mit der Länge des Hungerintervalls (Abb. 16) und erreichten nach 9 Tagen einen mittleren Wert von 1.2. Die Streuung zwischen den einzelnen Werten war aber zu groß, um anhand der RNA/DNA Verhältnisse die Länge des Hungerintervalls nach

einzelnen Tagen festzulegen. Daher erfolgte keine Angabe über die Zahl der Tage, die Larven vor dem Fang gehungert hatten, sondern nur eine Zuordnung in die Gruppen "3-4 Tage Hunger" bzw. "6-9 Tage Hunger". Bei 3-4 Tagen Hunger kann von einer Nahrungslimitation ausgegangen werden, von der sich die Larven, wenn wieder Futter zur Verfügung steht, nach 4-7 Tagen erholen können. Es wird angenommen, daß sich die Larven nach 6-9 Tagen Hunger nahe am "point of no return" befinden. Dabei scheint es sich bei diesem Hungerzeitraum um einen für die Rekrutierungsproblematik bedeutsamen Zeitraum zu handeln.

Die RNA/DNA Verhältnisse hungernder Fischlarven verschiedener Spezies zeigten auch bei Verwendung unterschiedlicher Analyseverfahren gute Übereinstimmung. Für 6-9 Tage hungernde Heringslarven ergaben sich in der vorliegenden Studie in Abhängigkeit von der Larvenlänge RNA/DNA Verhältnisse im Bereich von 1.2-1.5 im Vergleich zu 1.5 für 7 Tage hungernde Sandaale (BUCKLEY et al. 1984). Eine Verlängerung des Hungerintervalls auf 14 Tage führte beim Sandaal zu RNA/DNA Verhältnissen von 1.0 und stimmte damit gut mit dem hier ermittelten Wert von 1.1 bei 13 Tage hungernden Schlei-Heringslarven überein. HOVENKAMP (1990) ließ ältere Schollenlarven einige Wochen im Labor hungern und stellte fest, daß die RNA/DNA Verhältnisse nach 2 Wochen Futterentzug 1.0 erreichten und trotz Verlängerung des Hungerintervalls nicht noch weiter abnahmen. WRIGHT & MARTIN (1985) zeigten, daß sich das RNA/DNA Verhältnis bei hungernden *Morone saxatilis* auf einen Wert von 1.2 einstellt. LOUGHNA und GOLDSPIK (1984) zeigten an hungernden Regenbogenforellen, daß die Proteinbiosynthese in Hungersituationen nicht völlig gestoppt wird, sondern daß sie sich auf ein konstantes Niveau einstellt. Unterschiedliche Ergebnisse ergaben sich beim Vergleich der RNA/DNA Verhältnisse hungernder Steinbuttlarven. Im Gegensatz zu Untersuchungen von CLEMMESSEN (1985, 1987) an Steinbuttlarven, die nach 7 Hungertagen ein mittleres RNA/DNA Verhältnis von 1.3 erreicht hatten, nahmen die RNA/DNA Verhältnisse hungernder Steinbuttlarven in der vorliegenden Studie schneller ab und erreichten bereits nach 6 Hungertagen ein RNA/DNA Verhältnis von 0.6. Dies mag darauf zurückzuführen sein, daß es sich bei dem Wert für 6 Tage hungernde Steinbuttlarven um 13 Tage alte Larven handelt, die nach der Dotterresorption noch kein Futter erhalten hatten und die aufgrund fehlender Reservestoffe nur über ein geringes Hungerpotential verfügen. Eine schnellere Reaktion in der Abnahme der RNA/DNA Verhältnisse im Vergleich zu älteren Heringslarven wäre daher möglich.

Die Ergebnisse zeigen, daß sich das RNA/DNA Verhältnis einem Grenzwert nähert. Eine weitere Reduzierung des RNA/DNA Verhältnisses tritt wahrscheinlich nicht auf, da eine Minimalmenge von RNA in der Zelle vorhanden sein muß, um den Organismus am Leben zu erhalten. Wird dieser Level unterschritten, hat die Larve den "point of no return" erreicht und ist nicht mehr lebensfähig. Nach Untersuchungen von BLAXTER & EHRLICH (1974) erreichen Heringslarven diesen für das Überleben kritischen "point-of-no-return" je nach Alter und Temperatur nach 6-15 Tagen. Die RNA/DNA Verhältnisse der jüngeren Larven (7-10 mm) in der vorliegenden Studie zeigten nach 6-9 Hungertagen im Mittel Werte von 1.1-1.2 und lagen damit im Bereich des Grenzwertes. Ältere Larven aus der Laboraufzucht (20 mm Länge) erreichten dagegen nach 6-9 Hungertagen nur ein mittleres RNA/DNA Verhältnis von 1.6 (siehe "Hungerband"). Aufgrund ihrer größeren Mengen an Reservestoffen und deshalb größeren Hungertoleranz hatten die älteren Schleierlingslarven den Grenzwert von 1.1 erst nach 13 Hungertagen erreicht. Die Zunahme der RNA/DNA Verhältnisse von 6-9 Tage hungernden Heringslarven wie im "Hungerband" gezeigt, ist wahrscheinlich auf die zunehmende Hungertoleranz der größeren Larven zurückzuführen. 6-9 Tage Hunger führen daher bei älteren Larven wahrscheinlich nicht zu irreversiblen Schäden; die Larven werden aber deutliche Wachstumsreduktionen aufweisen und müssen damit eine verlängerte Larvalphase durchleben. Bei ausreichend langem Hungerintervall werden aber auch die RNA/DNA Verhältnisse älterer Fischlarven den Grenzwert erreichen. Je näher das RNA/DNA Verhältnis dem Grenzwert kommt, desto weniger sollte die Larvenlänge eine Rolle spielen. So zeigten 3-4 Tage hungernde Heringslarven im Labor noch eine deutliche Zunahme der RNA/DNA Verhältnisse mit der Larvenlänge. Bei 6-9 Tage hungernden Larven war die Längenabhängigkeit deutlich geringer. Bei noch längeren Hungerphasen sollten sich die RNA/DNA Verhältnisse um einen kritischen Grenzwert einpendeln und von der Larvenlänge unabhängig sein. Es wird daher angenommen, daß die RNA/DNA Verhältnisse von Fischlarven, die nach Resorption des Dotters schon einmal externe Nahrung aufgenommen haben, bevor sie Hungerphasen ausgesetzt waren, am "point of no return" unabhängig vom Alter der Larven im Mittel einen Wert von 1.0 aufweisen.

#### **RNA/DNA Verhältnisse im Tagesverlauf**

Bei der Bestimmung der Ernährungssituation von im Feld herangewachsenen Larven stellt sich die Frage, ob das Vorhandensein von Futterorganismen im Darm oder die Zeit der Probennahme einen Einfluß auf das RNA/DNA Verhältnis haben und für die Zustandsbegutachtung eine Rolle spielen könnten. Da Heringe ihre Beute visuell wahr-

nehmen, kann davon ausgegangen werden, daß die Nahrungsaufnahme hauptsächlich während des Tages erfolgt. Anhand von Darmanalysen und der Bestimmung der prozentualen Anteile von Larven mit Futterorganismen im Darm konnten Zeiten der größten Futteraufnahme kurz nach Sonnenaufgang und am Nachmittag beobachtet werden (BLAXTER 1986, COHEN & LOUGH 1983, CONWAY et al. 1991, SCHADT 1986). Tag- Nacht Unterschiede in der Freßaktivität konnten durch die Bestimmung der RNA/DNA Verhältnisse erwartungsgemäß nicht erfaßt werden. Auch das Vorhandensein von Futter im Darm ergab keine eindeutigen Veränderungen der RNA/DNA Werte der Fischlarven. Versuche von BUCKLEY (1980) an Winterflundern, die 18 h vor der Probennahme in gefiltertes Seewasser überführt wurden, um eine Leerung des Darmtraktes zu ermöglichen, bestätigten, daß das RNA/DNA Verhältnis nicht signifikant vom Füllungsgrad des Darmes zum Probennahmezeitpunkt abhängt. Nach Berechnungen von CLEMMESSEN (1985) lag der Anteil der externen aus Futterorganismen aufgenommenen Nukleinsäuren am Gesamtgehalt der Fischlarvennukleinsäuren bei 4.1 % für DNA und 7.1 % für RNA und damit im Bereich der Standardabweichungen der Nukleinsäurenachweismethoden. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen waren daher nicht zu erwarten.

#### Reaktion des RNA/DNA Verhältnisses auf Wiederanfütterung

Nach einem Hungerintervall wiederangefütterte Larven benötigen einige Tage bis sie die RNA/DNA Verhältnisse von gut ernährten Larven wieder erreicht haben. THEILACKER (1980) beobachtete, daß Makrelenlarven nach einem Hungertag zwei Tage brauchen, um die durch Hungern entstandenen Gewebeschädigungen zu beheben. MARTIN et al. (1985) fütterten *Morone saxatilis* nach 7 Hungertagen wieder an und stellten fest, daß die Larven die RNA/DNA Verhältnisse der während des gesamten Versuchs konstant gefütterten Larven nach 7 Tagen der Wiederanfütterung erreichten. In dem in dieser Arbeit beschriebenen Wiederanfütterungsversuch erreichten Heringslarven, die vier Tage gehungert hatten, nach sieben Tagen erneuter Fütterung wieder die RNA/DNA Verhältnisse konstant gefütterter Larven. Danach nahmen die RNA/DNA Verhältnisse sogar deutlich zu und lagen oberhalb der Werte der Futtergruppe. Dies wird auf einen Wachstumsschub zurückgeführt, mit dem der Wachstumsverlust während der Hungerzeit kompensiert wird. Hinweise auf solche Wachstumssteigerungen nach einer Hungerperiode oder limitiertem Futterangebot ergaben Untersuchungen von MIGLAVS & JOBLING (1989) an juvenilen Wandersaiblingen und von PEDERSEN et al. (1990) und OSIETZKI (1991) an Fischlarven. Da sich die Fischlarven von Hungerzeiten erst nach Tagen erholen können, werden die RNA/DNA Ver-

hältnisse der Larven, die eine längere Zeit gehungert haben und dann kurz vor dem Fang Futterorganismen aufgenommen haben, nicht auf diese plötzliche Futteraufnahme reagieren. Damit ist das RNA/DNA Verhältnis geeignet, die Ernährungslage, wie sie einige Tage vor dem Fang vorherrschte, zu beschreiben.

#### Einfluß der Futterdichte

Bei den Versuchen zum Einfluß der Futterdichte auf das RNA/DNA Verhältnis sollte untersucht werden, inwieweit Veränderungen in der Futterdichte über die Messung des RNA/DNA Verhältnisses erfaßt werden können. Fischlarven, die bei geringen Futterdichten aufwachsen, sollten einen schlechteren physiologischen Zustand aufweisen, da sie bei der Nahrungssuche ein größeres Wasservolumen absuchen und damit auch einen höheren Energieaufwand betreiben müssen. So beschrieben MUNK & KIORBOE (1985) eine 100 % höhere Schwimmaktivität bei Heringslarven, die bei einer geringen Futterdichte im Vergleich zu einer hohen Futterdichte gehältert wurden. Dies führte zu einer Reduzierung der für den Körperaufbau und das Wachstum vorhandenen Energiemenge.

COHEN & LOUGH (1983) berechneten, daß eine 15 mm lange Heringslarve für gutes Wachstum und hohe Überlebensraten eine tägliche Futterration von 20 µg Trockengewicht benötigt. BEYER (1980) dagegen geht von der 3-fachen Menge (60 µg Trockengewicht) aus. HOUDE (1989) gibt an, daß Heringslarven 60 Copepoden-Nauplien pro Tag fressen müssen, entsprechend einer Menge von 15 µg Trockengewicht. Nach THEILACKER & McMASTERS (1971) hat ein einzelner *Brachionus* Rotator ein Trockengewicht von 0.16 µg ; das Trockengewicht eines *Artemia* Nauplius liegt nach Angaben von BENJTS et al. (1975) bei 1.5 µg. Bei einer Futtertierdichte von 5 *Brachionus* + 1 *Artemia*/ml und einer Besatzdichte von 13 Larven/Liter, wie in der Heringslarvenaufzucht 1989 eingestellt, standen demnach einer Larve 177 µg Trockengewicht als Tagesfutterration (das 3-12fache der geforderten Menge) zur Verfügung. Im Vergleich dazu erhielt eine Larve, die bei 0.1 *Brachionus* + 0.01 *Artemia*/ml gehältert wurde, nur eine Ration von 2.4 µg Trockengewicht und lag damit um etwa den Faktor 10 unter der von COHEN & LOUGH (1983) angegebenen Menge. Die signifikant geringeren RNA/DNA Verhältnisse und das schlechtere Wachstum der Heringslarven, die bei der geringeren Futterdichte aufgewachsen waren, entsprachen damit den Erwartungen und bestätigten Ergebnisse anderer Autoren (BUCKLEY 1979, BUCKLEY et al. 1984, BULOW 1970, MIGLAVS & JOBLING 1989). Eine Verringerung der Futterdichte führte zwar zu einer Abnahme der

RNA/DNA Verhältnisse, erreichte aber dennoch im Mittel (Median der RNA/DNA Häufigkeitsverteilung = 2.1) keine für hungernde Individuen charakteristischen Werte (Median der RNA/DNA Häufigkeitsverteilung = 1.4), so daß der Indikator RNA/DNA Verhältnis empfindlich genug ist, um zwischen hungernden und schlecht ernährten Fischlarven zu unterscheiden.

### Temperatur

Heringslarven im Alter von 28-37 Tagen wurden bei 10 °C im Vergleich zu 14-16 °C aufgezogen. Die erste Probennahme der bei 10° C gehälterten Larven erfolgte am dritten Tag im Alter von 30 Tagen. Die niedrigere Temperatur führte bezogen auf das Alter der Larven zu signifikant geringeren RNA- und DNA- Gehalten und damit zu einem geringeren Wachstum. Dies könnte eine Verlängerung der Larvalphase und eine Verringerung der Überlebenswahrscheinlichkeit der Larven zur Folge haben. Den Einfluß der Temperatur auf Wachstumsraten bei Fischlarven zeigten BUCKLEY (1985), BUCKLEY et al. (1984), HOUDE (1989) und MARGULIES (1989), die feststellten, daß höhere Temperaturen zu höheren Wachstumsraten führten.

In der vorliegenden Studie waren sowohl der RNA- Gehalt als auch der DNA- Gehalt aufgrund der niedrigeren Temperatur verringert, daher ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den RNA/DNA Verhältnissen beider Temperaturgruppen. Somit hatte die nur kurzzeitig wirkende Temperaturemniedrigung (im Bereich von Tagen) keinen Einfluß auf das RNA/DNA Verhältnis und damit den Ernährungszustand der Larven. Dies wird weiterhin durch den Vergleich der längenbezogenen RNA- und DNA- Gehalte deutlich. Auch die Nukleinsäuregehalte in Abhängigkeit von der Larvenlänge zeigten keine signifikanten Unterschiede. Es ist daher anzunehmen, daß kurzfristig wirkende Temperaturemniedrigungen zu verringerten Proteinbiosynthese- und Stoffwechselraten führen, die sich durch geringere Wachstumsraten auszeichnen und durch eine Aktivitätsverringernng der Ribosomen und nicht durch eine Reduzierung in den Ribosomenanzahlen (RNA- Gehalt) gekennzeichnet sind. Gestützt wird diese Annahme durch die Ergebnisse über die RNA/DNA Verhältnisse bei langzeit- kälteangepaßten Fischen. GOOLISH et al. (1984) konnten bei Untersuchungen an Karpfen zeigen, daß die RNA- Gehalte und folglich auch die RNA/DNA Verhältnisse von Fischen, die an niedrige Temperaturen angepaßt waren, höher waren, um damit möglicherweise die geringere metabolische Aktivität der Ribosomen kompensieren zu können. Im Vergleich dazu ist zu erwarten, daß die RNA/DNA Verhältnisse von Fischlarven, die an höhere Temperaturen z.B. in den Tropen angepaßt sind, im Vergleich zu den

Larven der gemäßigten Gebiete bei gleicher Ernährungslage geringere RNA/DNA Verhältnisse aufweisen sollten, weil die Aktivität der Ribosomen bei höheren Temperaturen größer ist und für die gleiche Stoffwechselleistung eine geringere Ribosomenanzahl notwendig ist. Eine erste Bestätigung dieser Annahme zeigten eigene Ergebnisse zu RNA/DNA Bestimmungen an Fischlarven aus dem Indischen Ozean (SIEG et al. 1989).

#### **4.3 ANWENDUNG DER LABORERGERBNISSSE AUF LARVEN AUS IN SITU FÄNGEN ZUR BEURTEILUNG DES ERNÄHRUNGSZUSTANDES**

Anhand der Laborergebnisse konnte gezeigt werden, daß unterschiedliche Ernährungszustände von Herings- und Steinbuttlarven über die Messung des RNA/DNA Verhältnisses bestimmt werden können. Dies ist möglich, weil der DNA- Gehalt weitgehend unabhängig vom Ernährungszustand ist, der RNA- Gehalt dagegen bei schlechten Ernährungsbedingungen reduziert wird. Das RNA/DNA Verhältnis ist damit ein Parameter, der im Zusammenhang mit der Beurteilung der Aufwuchsbedingungen und Überlebenssituation von Fischlarven in See verwendet werden kann.

Basierend auf den Ergebnissen der Laborexperimente ergaben sich grundsätzlich zwei Möglichkeiten zur Beurteilung der Ernährungssituation von Larven aus in situ Bedingungen: Die Ernährungslage konnte entweder anhand der Ergebnisse an gefütterten Laborlarven ("Futterband" Definition siehe 3.2.3) oder an hungernden Laborlarven ("Hungerband" Definition siehe 3.2.3) eingeschätzt werden. Die RNA/DNA Verhältnisse von gefütterten und hungernden Laborlarven zeigten eine deutliche Längenabhängigkeit sowie starke individuelle Streuungen, die aber in den Hungergruppen weniger stark ausgeprägt waren. Trotz ausreichenden Futterangebots waren unter den gefütterten Larven Individuen zu finden, die für hungernde Larven charakteristische RNA/DNA Verhältnisse aufwiesen und zu starken Überschneidungen zwischen "Futterband" und "Hungerband" führten (z.B. Abb. 51). Es ist denkbar, daß die relativen Anzahlen der Larven, die trotz Futterangebots in einem schlechten Zustand waren, im Feld anders als in einer Laboraufzucht sind. Möglicherweise überleben unter Laborbedingungen aufgrund des fehlenden Wegfraßes durch Räuber kleinere und schlecht ernährte Larven, die in situ weggefressen worden wären. Die Definition gut ernährter Larven war unter Laborbedingungen wegen der großen Streuung und aufgrund der Überschneidungen mit den RNA/DNA Verhältnissen hungernder Larven schwierig. Vergleichsweise einfacher war es dagegen, Hungerzustände unter Laborbedingungen zu definieren, da die RNA/DNA Verhältnisse, die

bei 6-9 Tage hungernden Larven gefunden wurden, wirklich hungernden Tieren entsprachen. Da es für die Frage der Rekrutierungsproblematik wichtiger ist, Nahrungslimitation und schlecht ernährte Larven nachzuweisen, als gut ernährte Larven zu definieren, wurden zur Abschätzung des physiologischen Zustandes daher RNA/DNA Verhältnisse von 6-9 Tage hungernden Larven herangezogen. Dabei waren allerdings zwei Faktoren zu beachten:

- a) Eine Beurteilung der Ernährungslage anhand des RNA/DNA Verhältnisses von Heringslarven aus Felduntersuchungen konnte erst ab dem 10. Lebenstag nach dem Schlupf erfolgen, da im Labor vorher keine Trennung in Futter- und Hungergruppe möglich war. Für die Beurteilung des Ernährungszustandes von Feldlarven mußte daher sichergestellt sein, daß die Individuen bereits in der Lage waren, externe Nahrung aufzunehmen und zu verdauen.
- b) Die bei den Laborversuchen zur Kalibrierung des RNA/DNA Verhältnisses von 6-9 Tage hungernden Larven gefundene Variabilität und Längenabhängigkeit mußte berücksichtigt werden.

Ziel der Laborversuche mit hungernden Fischlarven war es, RNA/DNA Werte festzulegen, unterhalb derer die untersuchten Larven als hungernd bezeichnet werden können. Sie werden im weiteren Verlauf der Arbeit als kritische Grenzwerte bezeichnet. Bisher publizierte kritische Grenzwerte gingen von einem für alle Längen- und Altersgruppen allgemeingültigen mittleren RNA/DNA Verhältnis aus, das die natürliche Variabilität innerhalb der Gruppe hungernder Larven unberücksichtigt ließ. (BUCKLEY 1984, MARTIN et al. 1985, ROBINSON & WARE 1988). Erste Einschränkungen machte CLEMMESSEN (1989), die in Abhängigkeit vom Larvenalter zwei kritische Grenzwerte postulierte. Bis auf die Untersuchungen von CLEMMESSEN (1989) und ROBINSON & WARE (1988) basierten die angegebenen RNA/DNA Grenzwerte auf Ergebnissen, die an gepoolten Proben erzielt wurden und keine Erfassung der individuellen Streuung und Länge ermöglichten. ROBINSON & WARE (1988) ließen junge Heringslarven hungern und bestimmten ein mittleres RNA/DNA Verhältnis von 2.06 am 11. Versuchstag nach dem Schlupf. MARTIN et al. (1985) ermittelten einen Wert von 2.0 als kritischen Grenzwert anhand der höchsten RNA/DNA Werte von hungernden *Morone saxatilis* aus Laborversuchen. CLEMMESSEN (1989) gab einen kritischen RNA/DNA Grenzwert von 1.5 für junge Larven und 2.5 für ältere Larven an. Der Mittelwert der RNA/DNA Verhältnisse 6-9 Tage hungernder Heringslarven im Alter von 9-65 Tagen ohne Berücksichtigung der



Larvenlänge in der vorliegenden Studie lag mit 1.4 deutlich unter den angegebenen Grenzwerten der anderen Autoren. Durch die Einbeziehung der zweifachen Standardabweichung wurde ein Grenzwert von 2.2 bestimmt, der gut mit den oben genannten Grenzwerten anderer Autoren übereinstimmte.

Im Vergleich zu den bisher existierenden konstanten Grenzwerten ohne Berücksichtigung der Larvenlänge wird in dieser Studie erstmals ein fließender Grenzwert präsentiert, der die Larvenlängen und die individuellen Streuungen zwischen den Larven berücksichtigt und als "Hungerband" bezeichnet wird. Damit ließ sich zeigen, daß das mittlere RNA/DNA Verhältnis von 10 mm langen, 6-9 Tage hungernden Larven bei 1.2 lag und sich mit zunehmender Larvenlänge für 23 mm lange Heringslarven auf 1.7 erhöhte. Würde, wie bisher üblich, von einem konstanten längenunabhängigen mittleren RNA/DNA Grenzwert ausgegangen werden, käme es bei der Beurteilung des Ernährungszustandes von Larven aus in situ Untersuchungen zu Fehleinschätzungen. Der Anteil hungernder Larven der kleinen Längengruppen würde, basierend auf einem konstanten Grenzwert, überschätzt, der Anteil hungernder größerer Larven unterschätzt werden. Diese Zusammenhänge werden in Abb. 56 am Beispiel der Beurteilung der Ernährungslage der Heringslarven aus dem Englischen Kanal verdeutlicht. Zusätzlich zu dem in dieser Arbeit beschriebenen "Hungerband" ist ein konstanter längenunabhängiger Grenzwert, basierend auf den Ergebnissen von MARTIN et al. (1985) und ROBINSON & WARE (1988), dargestellt. Im Falle der Larvenprobe aus dem Englischen Kanal mit den dort vorgefundenen Längengruppen ergaben sich bei der Beurteilung anhand eines konstanten Grenzwertes im Vergleich zu dem 2s-Bereich des "Hungerbandes" die gleichen Anteile hungernder Larven. Bei der Beurteilung von kleineren und größeren Larven mit RNA/DNA Verhältnissen im Bereich der schraffierten Felder (Abb. 56) käme es, basierend auf dem konstanten Grenzwert, zu einer Überschätzung (schraffierter Bereich a.) bzw. Unterschätzung (schraffierter Bereich b.) des Anteils hungernder Larven. Um eine möglichst genaue Beurteilung der Ernährungslage zu gewährleisten, ist die Berücksichtigung der Längenabhängigkeit, wie sie im "Hungerband" erfolgt, erforderlich.

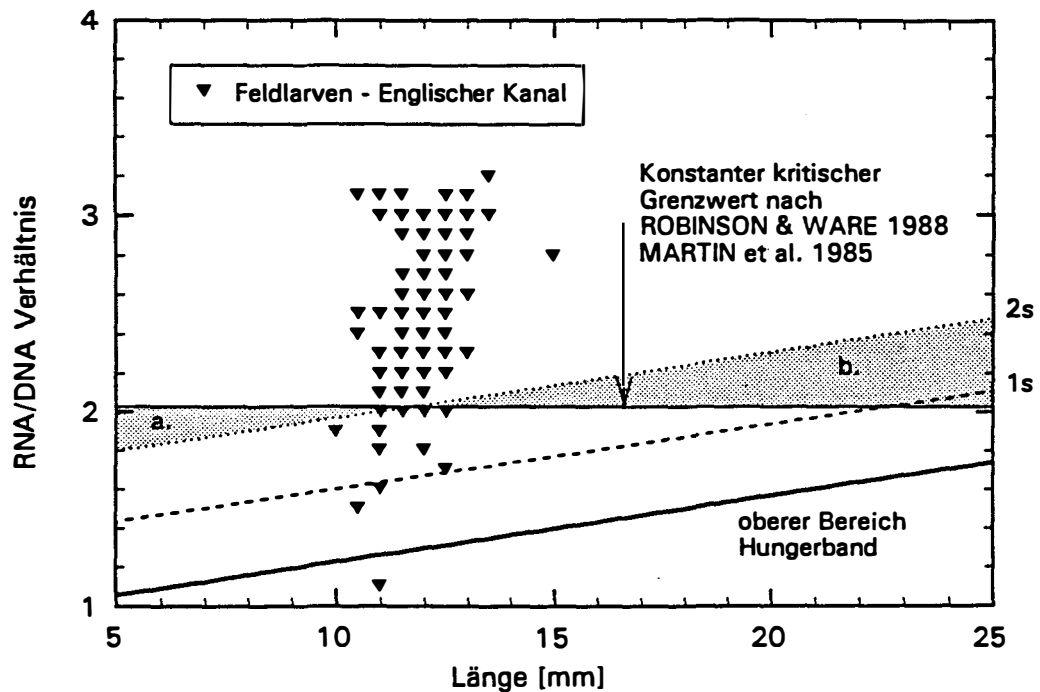


Abb. 56:

Beurteilung der Ernährungslage von Heringslarven aus dem Englischen Kanal anhand des "Hungerbandes" (oberer 1s- und 2s- Bereich) und eines aus der Literatur entnommenen konstanten Grenzwertes. Larven mit RNA/DNA Verhältnissen unterhalb des 2s-Bereichs des "Hungerbandes" und unterhalb des konstanten Grenzwertes werden als hungrig definiert. Die schraffierten Felder geben die RNA/DNA Bereiche an, die zu einer unterschiedlichen Aussage bei der Beurteilung des Ernährungszustandes führen, wenn die gezeigte Längenabhängigkeit unberücksichtigt bleibt. Im angegebenen Beispiel führt die Anwendung beider Beurteilungskriterien zu gleichen Ergebnissen.

Neben der Bestimmung des prozentualen Anteils hungriger Larven in einer Population läßt sich das RNA/DNA Verhältnis auch zur Beurteilung des allgemeinen Ernährungszustandes einer Untersuchungsgruppe verwenden. Anhand der relativen Häufigkeitsverteilungen der RNA/DNA Verhältnisse kann der mittlere Ernährungszustand bestimmt und vergleichend untersucht werden. Eine Verschiebung zu geringeren RNA/DNA Verhältnissen deutet auf eine schlechter ernährte Population hin. Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Längenabhängigkeit der RNA/DNA Verhältnisse ist dieser allgemeine Populationsvergleich anhand der relativen RNA/DNA Häufigkeitsverteilungen aber nur berechtigt, wenn gleiche Längengruppen analysiert werden (siehe z. B. Abb. 47).

#### 4.4 RNA/DNA VERHÄLTNISSE VON LARVEN AUS IN SITU UNTERSUCHUNGEN

Die Untersuchungen an den Fischlarven aus in situ Probennahmen haben exemplarischen Charakter und dienen dazu, die Eignung der Laborergebnisse zur Beurteilung der Ernährungslage von Larven in situ zu prüfen und erste Hinweise über die Bedeutung von Verhungerungserscheinungen in verschiedenen Seegebieten zu bekommen.

Es konnte festgestellt werden, daß Verhungerungserscheinungen hauptsächlich bei kleineren und damit wahrscheinlich jüngeren Heringslarven auftraten. Aber auch bei älteren Larven ließen sich, wenn auch in geringeren prozentualen Anzahlen, hungernde Individuen feststellen, so daß die "Verhungerungs-Hypothese" bestätigt werden konnte. Obwohl der direkte Vergleich der prozentualen Anteile hungernder Larven mit den von anderen Autoren ermittelten Werten problematisch ist, da verschiedene Fischarten unterschiedlichen Alters mit verschiedenen Methoden zur Beurteilung der Ernährungslage verwendet wurden, ergaben alle Studien eine höhere Anfälligkeit von jungen Larven gegenüber Verhungern und eine Abnahme der Anteile hungernder Larven mit zunehmendem Larvenalter. Die prozentualen Anteile hungernder Larven, die in der Literatur beschrieben sind, lagen zwischen 4-70 %. Der prozentuale Anteil junger hungernder Larven wird von der Höhe der Futterdichte zur Zeit der ersten Futteraufnahme der Larven beeinflußt sein. Weiterhin muß aufgrund der Ergebnisse aus dieser Studie berücksichtigt werden, daß eine Beurteilung der Ernährungssituation von jungen Larven nur erfolgen kann, wenn sichergestellt wird, daß die Umstellung von interner auf externe Ernährung abgeschlossen ist. Es mag daher in der Vergangenheit zu Fehleinschätzungen bei der Beurteilung junger Larven gekommen sein. Ergebnisse zur Ernährungssituation von Pazifischen Heringslarven, basierend auf RNA/DNA Bestimmungen, liegen von ROBINSON & WARE (1988) vor, die 28 % der jungen Larven als hungernd definierten und gute Übereinstimmung mit den hier ermittelten Werten zeigten. Im Vergleich dazu fanden BUCKLEY & LOUGH (1987) 50 % hungernde Schellfischlarven. Neben der Bestimmung von hungernden Larven anhand der RNA/DNA Verhältnisse wurden, basierend auf histologischen Kriterien, hungernde Fischlarven in situ von HEWITT et al. (1985), O'CONNELL (1980) und THEILACKER (1986) gefunden. Auch über die Analyse der Fettsäurezusammensetzung konnten Hungerzustände von Larven in See festgestellt werden (HAKANSON 1989 a, MARTIN et al. 1985, SETZLER-HAMILTON et al. 1987).

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse scheinen Hungererscheinungen bei den jüngeren Fischlarven, bedingt durch den Wechsel von interner auf externe Ernährung die entscheidende Rolle zu spielen, aber dennoch scheinen auch ältere Larven in Phasen der Nahrungslimitation geraten zu können. Hinweise darauf ergaben die Untersuchungen zur Bestimmung des Ernährungszustandes von 17-25 mm langen Heringslarven aus der Schlei, die einen Anteil von 80% hungernder Larven bei der 2. Schleiprobennahme zeigten. Dieser hohe Anteil hungernder Heringslarven war unerwartet, da bei der 1. Probennahme eine Woche vorher keine hungernden Larven gefunden wurden und es sich bei der Schlei um ein hoch produktives Gewässer mit einer im Mittel hohen Planktonkonzentration handelt (Primär- und Sekundärproduktion, NELLEN 1965, SCHNACK 1972). Die im Vergleich geringeren RNA/DNA Verhältnisse der 2. Schleiprobennahme deuten darauf hin, daß sich die Ernährungslage für die Larven innerhalb von einer Woche erheblich geändert haben muß. Mögliche Erklärungen wären Veränderungen in den Anzahlen der Planktonorganismen und deren Zusammensetzung oder Probleme bei der Umstellung auf größere Nahrungsorganismen, die zu einer Nahrungslimitation geführt haben könnten. Untersuchungen von LENZ (1970) und SCHNACK (1972) zeigten, daß in der Schlei im fraglichen Zeitraum (Anfang Juni) die Zooplanktonbiomasse aufgrund eines Zusammenbruchs in der Copepoden Population (*Eurytemora affinis*) sehr gering war. Da es sich bei *Eurytemora affinis* um die Hauptnahrungsorganismen von Heringslarven in der Schlei handelt, wird wahrscheinlich eine Nahrungslimitation für die Heringslarven vorgelegen haben. Weiterhin wurde eine Verzögerung in der natürlicherweise auftretenden Sukzession von *Acartia tonsa*, einer Art, die auf *Eurytemora* in der wärmeren Jahreszeit folgt, festgestellt (LENZ 1970, SCHNACK 1972). Ähnliche Befunde wurden von WALDMANN (1961) und N. BRIELMANN (pers. Mitt.) auch für den Greifswalder Bodden beschrieben, wo ein signifikanter Rückgang der *Eurytemora* Population im Juni festgestellt wurde. Als Grund für den schlechten Ernährungszustand der Schlei- Heringslarven in der hier vorliegenden Arbeit könnte daher ein Zusammenbruch in der *Eurytemora affinis* Population und eine Verzögerung der natürlichen Planktonsukzession zur Zeit der Probennahmen im Juli 1989 in Frage kommen. Da keine Daten zur Planktonsituation vorliegen, kann diese Hypothese aber nicht überprüft werden. Zusätzlich könnten sich die Ausbildung der Schwimmblase, die Umstellung von Haut-Oberflächenatmung auf Kiemenatmung und andere mit der Metamorphose verbundene Änderungen auf den Zustand der Larven ausgewirkt haben. Hinweise darauf ergaben die in dieser Untersuchung gezeigten Laboraufzuchtexperimente in denen wiederholt Reduktionen der RNA/DNA Verhältnisse bei den Futtergruppen auftraten.

Als weiterer Faktor für den schlechten Zustand der Larven könnte neben dieser natürlich bedingten Planktonsukzession auch eine Dezimierung des Fischlarvenfutterplanktons durch die Fischlarven selbst in Frage kommen. CUSHING (1983) vermutete, das ältere Fischlarven aufgrund ihres Futterbedarfs selber eine deutliche Reduktion ihres Futterplanktons bewirken können. Dieses spielt gerade in Phasen des Wechsels von Futterpopulationen eine wichtige Rolle und könnte eine plötzliche Nahrungsknappheit bewirken. Da die Fischlarvenbiomasse in der Schlei extrem hoch ist (SCHNACK 1972), könnte diese Hypothese dort zutreffen. Neben den hier gezeigten Hinweisen aus der Schlei deuten auch andere Untersuchungen darauf hin, daß ältere Larven ebenfalls kritischen Phasen bezüglich der Ernährungssituation ausgesetzt sein können, die möglicherweise die nachfolgende Rekrutierung beeinflussen. THOMPSON & HARROD (1991) berechneten für Dorschlarven aus der Irischen See, daß der tägliche Futterbedarf älterer Larven theoretisch zu einer signifikanten Dezimierung der Copepodenpopulation und damit zu Konkurrenzerscheinungen und Nahrungslimitation führen kann. Ältere hungernde Larven wurden von HAKANSON (1989 a) bei Untersuchungen an *Engraulis mordax* und von SETZLER-HAMILTON et al. (1987) bei *Morone saxatilis* gefunden. Auch für Gadiden in der Nordsee zeigte ECONOMOU (1987), daß die Überlebensbedingungen für ältere Larven aufgrund eines Zusammenbruchs in der benötigten Copepodenpopulation schlecht waren. Es ist wahrscheinlich, daß hungernde ältere Larven in anderen Studien nicht entdeckt wurden, da diese Altersgruppen nicht untersucht worden waren.

Um Hinweise über die Bedeutung von Verhungerungserscheinungen in verschiedenen Seegebieten zu bekommen, wurde ein Vergleich der Ernährungssituation von Heringslarven aus der nördlichen Nordsee, dem Englischen Kanal und dem Nord-Ostsee-Kanal durchgeführt, der zeigte, daß der Zustand der untersuchten Larven (ab 10 mm Länge) in der nördlichen Nordsee am besten und im Englischen Kanal am schlechtesten war. Das konnte sowohl anhand der prozentualen Anteile hungernder Larven aller untersuchten Längen als auch beim Vergleich der relativen RNA/DNA Häufigkeitsverteilungen für einzelne Längengruppen gezeigt werden. Heringslarven treten im Englischen Kanal zu einer Zeit auf, wenn die allgemeine Planktonsituation aufgrund der Wintersituation schlecht ist. Im Vergleich zur nördlichen Nordsee ist im Englischen Kanal die Planktondiversität, die Anzahl und Biomasse an Fischlarven und die Gesamtplanktonbiomasse, letztere um das 10fache, geringer (SCHADT 1986). Es ist möglich, daß die Verfügbarkeit an potentielltem Futterplankton für die Heringslarven unterschiedlich gewesen sein könnte, da beide Bestände signifikante Unterschiede in der Ernährungslage aufwiesen. Dies kann entweder durch unterschiedliche Futterdichten

oder Futterqualitäten in beiden Gebieten begründet gewesen sein. Hinweise auf deutliche Unterschiede in den Anzahlen kleiner Copepoden, die nach Untersuchungen von SCHADT (1986) bevorzugt von den Heringslarven der Längengruppen von 10-16 mm aufgenommen wurden, konnten von A. RÖPKE (pers. Mitt.) festgestellt werden. Im Englischen Kanal waren die mittleren Konzentrationen um etwa den Faktor 6 geringer. Es wird angenommen, daß die Situation für das Mikrozooplankton ähnlich gewesen sein muß. Eine vollständige Analyse des potentiellen Futterplanktons für beide Untersuchungsgebiete liegt jedoch nicht vor. Ob für die generell schlechtere Ernährungslage der Heringslarven aus dem Englischen Kanal nur die im Mittel geringere Planktonkonzentration oder die fehlende räumlich-zeitliche Übereinstimmung im Auftreten der Nahrungspartikel und der Heringslarven verantwortlich ist, konnte anhand dieser Studie nicht ermittelt werden.

Eine Abschätzung der Wachstumsleistung über den Proteinzuwachs für Heringslarven aus den Untersuchungsgebieten Englischer Kanal und nördliche Nordsee konnte anhand der von BUCKLEY (1984) gefundenen Beziehung zwischen Proteinwachstumsrate, RNA/DNA Verhältnis und Wassertemperatur ermittelt werden. BUCKLEY konnte für 8 Fischarten der gemäßigten Breiten zeigen, daß sich die Proteinwachstumsrate durch Bestimmung des RNA/DNA Verhältnisses unter Berücksichtigung der Wassertemperatur vorhersagen läßt. Hohe Proteinwachstumsraten entsprechen guten Ernährungszuständen und führen zu hohen Überlebensraten der Larven, da die Wachstumsrate die Dauer der Larvalphase und damit die Überlebenswahrscheinlichkeit der Larven beeinflußt (HOUDE 1987). BUCKLEY (1984) stellte folgende Beziehung auf:

$$P = 0.93 T + 4.75 \text{ RNA/DNA} - 18.18$$

P	=	Proteinzuwachs in % / Tag
T	=	Wassertemperatur in ° C
RNA/DNA	=	mittleres RNA/DNA Verhältnis

Basierend auf den mittleren an den Heringslarven bestimmten RNA/DNA Verhältnissen und den in beiden Untersuchungsgebieten vorherrschenden Wassertemperaturen ergaben sich Proteinzuwachsraten von 9.1 % / Tag für die Larven aus der nördlichen Nordsee im Vergleich zu 0.7 % / Tag im Englischen Kanal. Da höhere Temperaturen zu einer höheren Wachstumsrate führen (siehe 4.2, Seite 93), wäre bei gleicher Ernährungslage in der nördlichen Nordsee (11.2 °C) eine höhere Wachstumsrate im Vergleich zum Englischen Kanal (7.4 °C) zu erwarten. Um diesen Temperatureffekt zu erfassen, wurde der Proteinzuwachs in der nördlichen Nordsee bei 7.4 °C berechnet.

Nach der Formel von BUCKLEY ergäbe sich dann für diese Temperatur ein Wert von 5.4 % / Tag, der immer noch deutlich über dem für den Englischen Kanal bestimmten Wert von 0.7 % / Tag liegt. Somit zeigten sich nicht nur im Ernährungszustand, sondern auch bei den eng damit verknüpften Wachstumsraten signifikante Unterschiede zwischen beiden Untersuchungsgebieten. Im Vergleich zu den hier bestimmten Wachstumsraten fand BUCKLEY (1984) bei Heringslarven, die bei > 2 Organismen/ml (Naturplankton) gehältert wurden, eine Proteinzuwachsrate von 6.8 % / Tag. Die in der nördlichen Nordsee ermittelte Rate von 9.1 % / Tag deutet damit auf eine hohe Futterdichte und sehr gute Wachstumsbedingungen hin. Dagegen zeigten bei geringen Futterdichten gehälterte Sandaallarven (0.01 Organismen / ml Naturplankton) nur einen Proteinzuwachs von 1.4 % (BUCKLEY et al. 1984). Die im Englischen Kanal gefundene Wachstumsrate von nur 0.7 % und die geringeren RNA/DNA Verhältnisse sind damit vermutlich auf eine geringe Futterdichte oder ungeeignetes Plankton zurückzuführen und bedeuten wahrscheinlich für die Larven eine reduzierte Wachstumsrate und damit eine verlängerte Larvalphase im Vergleich zu den Larven aus der nördlichen Nordsee. Damit vergrößert sich der Zeitraum, in dem die Fischlarven Räubern zum Opfer fallen können (HOUDE 1987); außerdem werden hungernde Larven wegen ihrer geringeren Schwimmaktivität leichter von Räubern erbeutet (FOLKVORD & HUNTER 1986, RICE et al. 1987). So dürften Nahrungsmangel und Räuberdruck gemeinsam zu einer Dezimierung der Bestandszahlen führen. Um diese Hypothese bestätigen zu können, ist eine Abschätzung der potentiellen Biomasse der Fischlarven- Räuber erforderlich, da zu prüfen ist, wie sich die Wintersituation im Englischen Kanal auf die Menge und Aktivität potentieller Fischlarvenräuber auswirkt.

Die Ergebnisse zur Bestimmung der Ernährungslage der Heringslarven aus dem Nord-Ostsee-Kanal entsprachen den Erwartungen. Die aufgrund der Planktonsituation angenommene Mittelstellung im Vergleich zur nördlichen Nordsee und dem Englischen Kanal, ließ sich auch durch die Bestimmung des Ernährungszustandes bestätigen. Auffällig war, daß die RNA/DNA Verhältnisse besonders der großen Larven aus dem Nord-Ostsee-Kanal die größte Streuung aufwiesen. Da diese Größengruppen in den anderen Untersuchungsgebieten nicht vorkamen, war ein Vergleich nicht möglich. Ein direkter Vergleich des Ernährungszustandes der Schleil-Larven mit den Larven aus den anderen Untersuchungsgebieten war aufgrund des geringen Datensatzes und der unterschiedlichen Längenverteilung nicht durchführbar.

#### **4.5 VERGLEICH DER RNA/DNA VERHÄLTNISSE VON LARVEN AUS LABOR- UND FELDPROBEN**

Die RNA/DNA Verhältnisse der Larven aus dem Englischen Kanal und dem Nord-Ostsee-Kanal lagen im Bereich der unter Laborbedingungen ermittelten RNA/DNA Verhältnisse gefütterter Heringslarven ("Futterband"). Bei den Heringslarven aus der nördlichen Nordsee befanden sich die RNA/DNA Verhältnisse im Vergleich zu den Larven aus dem Labor, dem Englischen Kanal und dem Nord-Ostsee-Kanal deutlich im oberen Streubereich und oberhalb des Labor- "Futterbandes". Ihre Ernährungssituation war damit im Mittel besser als die der gefütterten Laborlarven und der Larven aus den anderen Untersuchungsgebieten. Die Laboraufzuchtbedingungen waren also vermutlich nicht optimal, aber dennoch geeignet, den Ernährungszustand von Heringslarven aus der Schlei unter Laborbedingungen aufrecht zu erhalten bzw. zu verbessern. Die mittleren RNA/DNA Verhältnisse der gefütterten Heringslarven im Experiment entsprachen weiterhin den RNA/DNA Verhältnissen von Heringseiern. Da sich Eier durch einen guten physiologischen Zustand auszeichnen sollten, ist davon auszugehen, daß die im Labor eingestellten Bedingungen für das Überleben und Wachstum der Heringslarven geeignet waren.

Daß in der Natur Larven mit im Mittel besserem Ernährungszustand und höheren RNA/DNA Verhältnissen als bei gefütterten Laborlarven zu finden waren, könnte auf lokal höhere Futterkonzentrationen ("Patchiness", z.B. LASKER 1975, 1981) im Vergleich zu Laborbedingungen, bessere Futterqualität, größeres Wasservolumen und natürliche Licht- und Sedimentverhältnisse zurückgeführt werden. Ein Vergleich der Futterdichte im Experiment mit der im Feld gefundenen ist problematisch, wenn nur die mittleren Planktonkonzentrationen betrachtet werden. In letzter Zeit wird immer mehr davon ausgegangen, daß nicht die Menge des Gesamtplanktons, sondern das jeder einzelnen Larve in ihrem Aktionsradius zur Verfügung stehende Plankton das Wachstum und die Überlebensrate der Larven beeinflussen (BORGMANN & RALPH 1983, COOMBS et al. 1981). Die in See bestimmte Futterdichte sollte daher immer zusammen mit der vorgefundenen Larvendichte interpretiert werden. Erschwerend kommt hinzu, daß die Charakteristik des Futters zusätzlich noch über kurze Distanzen (0.1 - 10 m) und kurze Zeitskalen (etwa 6 Stunden) erheblich variieren kann (FRANK & LEGGETT 1986). Aussagen über unterschiedliche Futterdichten bei Feld- und Laboruntersuchungen, als Gründe für die unterschiedlichen Ernährungslagen, müssen daher mit Vorsicht betrachtet werden. Aber nicht nur die Futterdichten, sondern auch die Futterqualität und die unterschiedlichen Aufwuchsbedingungen zwischen Labor und



Feld wirken sich auf den Zustand der Larven aus. Nach Untersuchungen von BLAXTER (1968) und CHECKLEY (1984) führte Naturplankton im Vergleich zu *Artemia* Nauplien zu besserem Wachstum. RAAE et al. (1988) fanden höhere RNA/DNA Verhältnisse und besseres Wachstum bei Dorschlarven, die in Salzwasserteichen im Vergleich zu Laborbedingungen aufgewachsen waren. Untersuchungen von OIESTAD et al. (1985) an Dorschlarven in eingeschlossenen natürlichen Wasserkörpern ("Enclosure") und ECONOMOU (1987) an Gadidenlarven in der Nordsee zeigten höheres Wachstum und bessere Überlebensraten im Vergleich zu Laboraufzuchtbedingungen. Auch BUCKLEY et al. (1984) fanden höhere RNA/DNA Verhältnisse bei Sandaalen aus Felduntersuchungen. Es ist weiterhin denkbar, daß der schlechtere Zustand der Laborlarven im Vergleich zu den Feldlarven auf den fehlenden Wegfraß der schlecht ernährten Larven durch Räuber unter Laborbedingungen zurückzuführen ist und daher zu einer im Mittel schlechter ernährten Versuchsgruppe im Vergleich zu einer Feldpopulation führt. Das Fehlen von Feldlarven in unteren Streubereich des "Hungerbandes", könnte ein Hinweis darauf sein, daß durch Hungern stark geschwächte und geschädigte Larven Räubern zum Opfer fallen oder zu Boden sinken und in der Wassersäule nicht mehr nachweisbar sind (ROSENTHAL & ALDERDICE 1976). Weiterhin ist wahrscheinlich, daß Hungern wie es unter Laborbedingungen eingestellt werden kann, nämlich als absoluter Futterentzug über mehrere Tage, unter natürlichen Bedingungen nicht vorkommt, und solche extremen Hungerzustände, gekennzeichnet durch RNA/DNA Verhältnisse im unteren Streubereich des Labor-"Hungerbandes", in der Natur selten sind.

#### 4.6. SCHLUBBETRACHTUNG UND AUSBLICK

Es konnte gezeigt werden, daß die in dieser Arbeit entwickelten Methoden für den quantitativen Nachweis von RNA- und DNA- Gehalten aus Ganzkörperhomogenaten von einzelnen Fischlarven geeignet sind und daß das RNA/DNA Verhältnis als Indikator zur Beschreibung der Ernährungslage dienen kann. Damit kann über die Bestimmung des RNA/DNA Verhältnisses von Fischlarven die Bedeutung der "Verhungerungs- Hypothese" und die Variabilität im Ernährungszustand einer Larvenpopulation untersucht werden. Die Eignung der Methode zur Messung der Nukleinsäuregehalte von Fischlarven an Bord von Forschungsschiffen und der Einsatz der Methode zur Beurteilung der Ernährungslage von Larven aus Feldproben konnte gezeigt werden.

Bei der Auswertung der zu diesem Themenkomplex vorliegenden Arbeiten war ein direkter Vergleich der RNA/DNA Verhältnisse schwierig, da sie mit unterschiedlichen Nukleinsäurenachweismethoden ermittelt worden waren. Daher ist es wünschenswert, die vorhandenen Nukleinsäurenachweismethoden zu standardisieren und Interkalibrierungsmessungen zu unternehmen. Ohne die Kenntnis von Faktoren wie Temperatur, Futterdichte, Futterverwertbarkeit und Entwicklungsstufe, die die RNA/DNA Verhältnisse beeinflussen, ist ein direkter Vergleich der RNA/DNA Verhältnisse gefütterter Larven kaum möglich. Auch die Vergleichbarkeit von Futterdichten zwischen Feld- und Laboruntersuchungen ist problematisch. Es liegen Hinweise vor, daß Larven verschiedener Arten unterschiedlich an ökologische Situationen angepaßt sind und vorhandene Futterorganismen unterschiedlich nutzen und verwerten. Damit benötigen sie auch unterschiedliche Optimalmengen von Futter für gutes Wachstum und hohe Überlebenswahrscheinlichkeiten (BUCKLEY & LOUGH 1987, BUCKLEY et al. 1984). Ein allgemeingültiges Modell zur Beurteilung gut ernährter Larven wird daher schwierig zu erstellen sein. Anders könnte die Situation bei hungernden Fischlarven unterschiedlicher Arten sein. Obwohl die DNA- Gehalte artspezifisch sind (HINEGARDNER 1968, VON DER DECKEN 1989), scheint sich das RNA/DNA Verhältnis hungernder Larven bei ausreichend langen Hungerzeiten, die artspezifisch unterschiedlich sein können, einem allgemeingültigen Grenzwert asymptotisch zu nähern. Die unterschiedlichen Reaktionen der RNA/DNA Verhältnisse hungernder Steinbuttlarven im Vergleich zu hungernden Heringslarven könnten darauf zurückzuführen sein, daß es sich bei den 6 Tage hungernden Steinbuttlarven um 13 Tage alte Larven handelt, die nach der Dotterresorption noch kein Futter erhalten hatten. Es ist denkbar, daß sie aufgrund fehlender Reservestoffe und damit verbundener geringerer Hungerresistenz bereits den hier postulierten asymptotischen Grenzwert unterschritten hatten. Eine vergleichbare Untersuchung von CLEMMESSEN (1987) konnte die schnellere und stärkere Abnahme der RNA/DNA Verhältnisse hungernder Steinbuttlarven im Vergleich zu Heringslarven nicht feststellen. Damit scheint die Übertragbarkeit der hier gezeigten RNA/DNA Verhältnisse hungernder Heringslarven auf andere Arten möglich, wenn die unterschiedlichen Entwicklungsphasen der Larven und ein möglicher Temperatureffekt, der noch weiterer Überprüfung bedarf, berücksichtigt werden. Die in dieser Arbeit gefundene Längenabhängigkeit des RNA/DNA Verhältnisses hungernder Heringslarven ist nicht direkt auf andere Spezies übertragbar. Die den Längengruppen entsprechenden Entwicklungsstufen könnten aber verglichen werden. Vielversprechend sind die Ergebnisse von BUCKLEY (1984), der in seinem Modell zur Bestimmung des Proteinzuwachses von Fischlarven anhand von RNA/DNA

Verhältnissen und Temperatur basierend auf Daten von 8 Arten keine artspezifischen Unterschiede zeigen konnte.

Um das Maß der in dieser Studie gezeigten Variabilität der RNA/DNA Verhältnisse genauer definieren zu können, muß bei zukünftigen Laborexperimenten in noch stärkerem Maße auf eine Optimierung der Aufzuchtbedingungen und konstante Temperatur- und Futterverhältnisse geachtet werden. Auch die Anzahl der Parallelproben der verschiedenen Ernährungsgruppen sollte deutlich erhöht werden. Die Fütterung der Larven mit den jeweiligen Copepoden- Stadien oder Naturplankton im Vergleich zu *Artemia* Nauplien ist anzustreben. Versuche zur Wiederaufzucht hungernder Larven wären wichtig, um die Verwendbarkeit des RNA/DNA Verhältnisses zur Bestimmung des "point of no return" näher untersuchen zu können.

Da die Wassertemperatur, bei der die Larven leben, einen erheblichen Einfluß auf das RNA/DNA Verhältnis zu haben scheint (BUCKLEY 1984), bedürfen diese Zusammenhänge einer näheren Untersuchung. Dabei stellt sich die Frage, ob Fischlarven, die bei geringeren Temperaturen leben müssen, generell höhere Ribosomengehalte und damit höhere RNA/DNA Verhältnisse bei gleichen Ernährungsbedingungen aufweisen im Vergleich zu Tieren, die bei höheren Temperaturen aufwachsen. Sie wären damit in der Lage, die auf Grund der geringeren Temperatur geringere Aktivität der Ribosomen durch eine höhere Anzahl von Ribosomen zu kompensieren. Diese Problematik könnte in Aufzuchtexperimenten überprüft und zusätzlich direkt auf der Ebene der Proteinbiosynthese exemplarisch untersucht werden. Die Proteinbiosyntheseleistung kann durch den Einbau von radioaktiv markierten Aminosäuren bei der Translation direkt verfolgt werden (LIED et al. 1982, HOULIHAN et al. 1988). Seit kurzem existiert eine Methode, die es ermöglicht, die Proteinbiosyntheserate an einer gepoolten Larvenprobe (50-100 Individuen) direkt zu messen (HANSEN et al. 1989). In weiteren Aufzuchtversuchen muß geklärt werden, ob höhere Temperaturen zu einer Beschleunigung der Reaktion der RNA/DNA Verhältnisse auf Hungerzustände führen und damit zu einem schnelleren Erreichen der kritischen Grenzwerte.

Da das RNA/DNA Verhältnis auch bei anderen marinen Organismen zur Bestimmung der physiologischen Kondition geeignet war (DeBOISE & TAGHON 1988, DORTCH et al. 1983, WANG & STICKLE 1986, WRIGHT & HETZEL 1985), sollte die hier präsentierte fluorimetrische Nukleinsäureanalysemethode auch auf andere Organismengruppen übertragbar sein, gerade dann wenn nur sehr wenig Gewebematerial zur Verfügung steht (ca. 25 µg Trockengewicht). Das RNA/DNA Verhältnis ist nicht nur

zur Überprüfung der "Verhungerungs- Hypothese", sondern auch zur Klärung aquakulturrelevanter Fragen geeignet. Es bietet sich als Index zur Abschätzung der für das Wachstum und die Entwicklung optimalen Futtertierdichte und Futterqualität unter Aufzuchtbedingungen an. Eine weitere interessante Anwendungsmöglichkeit der RNA/DNA Messungen ist die Bestimmung von Wachstumsreduktionen unter dem Einfluß von Giftstoffen. Nach Untersuchungen von BARRON und ADELMAN (1984) führten toxische Substanzen wie Zyan-Wasserstoff, Chrom und p-Kresol zu einer Reduktion des RNA- Gehaltes und des RNA/DNA Verhältnisses im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

Zukünftige Untersuchungen zur Ernährungssituation von Fischlarven sollten in Ichthyoplankton- Surveys integriert werden und eine gezielte Kohortenverfolgung zur Überprüfung von Verhungerungserscheinungen in Abhängigkeit von der Larvalphase beinhalten. Auch die älteren Larven und die post-larvalen Stadien sollten auf Hungererscheinungen untersucht werden, da sich Hinweise auf verhungerungsbedingte Mortalitäten dieser älteren Stadien mehren. Zur weiteren Überprüfung der in der Schlei gezeigten Befunde plötzlich auftretender hoher Anteile hungernder Larven sollte im Zeitraum Juni/Juli neben der Bestimmung des physiologischen Zustandes der Fischlarven eine Untersuchung des potentiellen Fischlarvenfutterplanktons erfolgen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Arbeit war es, eine Methode zur quantitativen Bestimmung von RNA- und DNA- Gehalten aus einzelnen Fischlarven zu entwickeln, die RNA/DNA Verhältnisse in Laboraufzuchtexperimenten zu kalibrieren und zur Bestimmung des Ernährungszustandes von Fischlarven aus Felduntersuchungen anzuwenden.

Durch Einsatz spezieller Reinigungsverfahren und der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen wurde eine hoch empfindliche, gut reproduzierbare Nukleinsäurenachweismethode zur Bestimmung der RNA- und DNA- Gehalte einzelner Fischlarven im Bereich von 0.1-1.0 µg/ml entwickelt.

Aufzuchtversuche unter Laborbedingungen wurden an Larven von kommerziell wichtigen Nutzfischarten, dem Hering (*Clupea harengus*) und dem Steinbutt (*Scophthalmus maximus*), durchgeführt. Die RNA- und DNA- Gehalte von Herings- und Steinbuttlarven zeigten eine exponentielle Zunahme mit dem Alter der Larven und damit die Möglichkeit zur Nutzung dieses Parameter für Wachstumsuntersuchungen. Es konnte gezeigt werden, daß das RNA/DNA Verhältnis als Indikator zur Charakterisierung des Ernährungszustandes geeignet ist, da RNA unter Hungerzuständen abgebaut wird, der DNA- Gehalt dagegen unabhängig vom Ernährungszustand konstant bleibt. Der Einfluß von Hungerzeiten von 2-9 Tagen auf die RNA/DNA Verhältnisse wurde untersucht, die Ergebnisse in zwei Gruppen "3-4 Tage Hunger" und "6-9 Tage Hunger" zusammengefaßt und mit den RNA/DNA Verhältnissen der gefütterten Larven verglichen. Bereits nach 3-4 Tagen Futterentzug war eine signifikante Trennung zwischen hungernden und gefütterten Larven möglich. Das RNA/DNA Verhältnis nahm mit zunehmendem Hungerintervall ab und zeigte innerhalb von 2-9 Hungertagen einen linearen Kurvenverlauf. Eine weitere Verlängerung der Hungerzeit auf 13 Tage zeigte, daß sich das RNA/DNA Verhältnis einem Grenzwert von etwa 1.0 nähert, der wahrscheinlich einem Minimalgehalt an RNA pro Zelle entspricht, den der Organismus zum Überleben braucht.

Das RNA/DNA Verhältnis nahm mit dem Alter der Larven sowie mit der Larvenlänge linear zu. Die Steigung der Regressionsgeraden war bei den gefütterten Larven am stärksten, bei den 6-9 Tage hungernden Larven am geringsten. Auch die Streuung der RNA/DNA Verhältnisse zwischen den Individuen der jeweiligen Längengruppen war am höchsten bei den gefütterten und am geringsten bei den hungernden Larven.

Anhand der RNA/DNA Verhältnisse der 6-9 Tage hungernden Heringslarven wurden unter Berücksichtigung der Larvenlängen und der individuellen Streuungen RNA/DNA Grenzwerte festgelegt, unterhalb derer die untersuchten Larven als hungernd bezeichnet werden können ("Hungerband"). Eine Beurteilung der Ernährungslage von Heringslarven bis zu einem Alter von 10 Tagen (Zeitraum der Umstellung von interner auf externe Ernährung) war nicht möglich, da die RNA/DNA Verhältnisse gefütterter Larven nicht von denen der hungernden Larven zu unterscheiden waren.

Der Einfluß der Futterdichte auf den Ernährungszustand der Larven konnte gezeigt werden. Heringslarven, die bei einer verringerten Futterdichte aufgewachsen waren, hatten signifikant geringere RNA/DNA Verhältnisse. Der Indikator "RNA/DNA Verhältnis" war empfindlich genug, um zwischen hungernden und schlecht ernährten Fischlarven zu unterscheiden.

Der Einfluß der über die Nahrung der Fischlarven aufgenommenen RNA- und DNA-Mengen aus den Futtertieren war unbedeutend. Unterschiede im Ernährungszustand in Abhängigkeit von der Tageszeit waren über die Messung der RNA/DNA Verhältnisse nicht nachweisbar. Erst längerfristige Veränderungen in der Ernährungssituation im Bereich von Tagen führten zu einer Änderung im Ribosomengehalt und ließen sich mit der hier verwendeten Meßtechnik erfassen.

Es ließ sich zeigen, daß die Laboraufzuchtbedingungen geeignet waren, den Ernährungszustand von Heringslarven aus der Schlei unter Laborbedingungen aufrecht zu erhalten bzw. zu verbessern. Die mittleren RNA/DNA Verhältnisse der gefütterten Heringslarven im Experiment entsprachen weiterhin den RNA/DNA Verhältnissen von Heringseiern, die sich durch einen guten physiologischen Zustand auszeichnen sollten.

Eine Zustandsbegutachtung der Feldlarven erfolgte anhand der RNA/DNA Verhältnisse von 6-9 Tage hungernden Larven unter Berücksichtigung der gefundenen Längenabhängigkeit. Ein Vergleich der Ernährungssituation von Heringslarven aus der nördlichen Nordsee, dem Englischen Kanal und dem Nord-Ostsee-Kanal ergab, daß der Zustand der untersuchten Larven (ab 10 mm Länge) in der nördlichen Nordsee am besten und im Englischen Kanal am schlechtesten war. Die Larven aus dem Nord-Ostsee-Kanal nahmen im Vergleich eine Mittelstellung ein. Das konnte sowohl anhand der prozentualen Anteile hungernder Larven aller untersuchten Längen als auch beim Vergleich der relativen RNA/DNA Häufigkeitsverteilungen für einzelne Längengruppen gezeigt werden. Hungernde Larven wurden in allen Untersuchungsgebieten

gefunden. Die höchsten prozentualen Anteile hungernder Larven waren in den kleineren Längengruppen (6-9 mm) und damit bei den wahrscheinlich jüngeren Larven zu finden. Aber auch bei älteren Larven ließen sich, wenn auch in geringeren prozentualen Anzahlen, hungernde Individuen feststellen, so daß die "Verhungerungshypothese" bestätigt werden konnte.

## 6. LITERATUR

- ALDERDICE, D.F. & VELSEN, F.P.J., 1971: Some effects of salinity and temperature on early development of Pacific herring. J. Fish. Res. Bd. Can. 28: 1545-1562.
- BAHRS, P., 1981: Wirkung verschiedener Fungizide auf die Entwicklung von Fischeiern. Dipl. Arbeit, Universität Kiel.
- BAILEY, K.M. & HOUDE, E.D., 1989: Predation on eggs and larvae of marine fishes and the recruitment problem. Advances in Marine Biology 25, 1-83.
- BALBONTIN, F., DeSILVA, S.S. & EHRLICH, K.F., 1973: A comparative study of anatomical and chemical characteristics of reared and wild herring. Aquaculture 2, 217-240.
- BARRON, M.G. & ADELMAN, I.R., 1984: Nucleic acid, protein content, and growth of larval fish sublethally exposed to various toxicants. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 41, 141-150.
- BEERS, P.C. & WITTLIFF, J.L., 1975: Measurements of DNA and RNA in mammary gland homogenates by the ethidium bromide technique. Anal. Biochem. 63, 433-441.
- BENJTS, F., VAN VOORDEN, E. & SORGELOOS, P., 1975: Changes in the biochemical composition of the early stages of the brine shrimp, *Artemia salina* L.. 10th Europ. Symp. Mar. Biol. 1: 1-9.
- BENTLE, L.A., DUTTA, S. & METCOFF, J., 1981: The sequential enzymatic determination of DNA and RNA. Anal. Biochem. 116, 5-16.
- BEYER, J.E., 1980: Feeding success of clupeoid fish larvae and stochastic thinking. Dana 1, 65-91.
- BLAXTER, J.H.S., 1968: Rearing larval herring to metamorphosis and beyond. J. mar. biol. Ass. U.K. 48, 17-28.
- BLAXTER, J.H.S., 1971: Feeding and condition of Clyde herring larvae. Rapp. P.-v. Reun. Cons. Int. Explor. Mer. 160, 128- 136.
- BLAXTER, J.H.S., 1981: The rearing of larval fish. In: Aquarium systems (ed. A.D. Hawkins), 303-323. Academic Press, London.
- BLAXTER, J.H.S., 1986: The development of sense organs and behaviour in teleost larvae with special reference to feeding and predator avoidance. Trans. Am. Fish. Soc. 115, 98-114.
- BLAXTER, J.H.S., 1988: Pattern and variety in development. In: Fish Physiology, Vol. 11 A (eds. W.S. Hoar & D.J. Randall), 1-58. Academic Press, New York.



- BLAXTER, J.H.S. & EHRLICH, K.F., 1974: Changes in behaviour during starvation of herring and plaice larvae. In: Blaxter, J.H.S. (ed.) Early life history of fish. Springer Verlag, Heidelberg/Berlin, 575-588.
- BLAXTER, J.H.S. & HEMPEL, G., 1963: The influence of egg size on herring larvae (*Clupea harengus* L.). J. Cons. Int. Explor. Mer 28, 211-240.
- BLAXTER, J.H.S. & STAINES, M.E., 1971: Food searching potential in marine fish larvae. In: Crisp, D.J. (ed.) 4th European Marine Biology Symposium. Cambridge University Press, Cambridge, 467-485.
- BOER, G.J., 1975: A simplified microassay of DNA and RNA using ethidium bromide. Anal. Biochem. 65, 225-231.
- BORGMANN, U. & RALPH, K.M., 1985: Feeding, growth and particle-size conversion efficiency in white sucker larvae and young common shiners. Env. Biol. Fish. 14, 269-279.
- BRUNK, C.F., JONES, K.C. & JAMES, T.W., 1979: Assay of nanogram quantities of DNA in cellular homogenates. Anal. Biochem. 92, 497- 500.
- BUCKLEY, L.J., 1979: Relationship between RNA/DNA ratio, prey density and growth rate in Atlantic Cod (*Gadus morhua*) larvae. J. Fish. Res. Bd. Can. 36, 1497- 1502.
- BUCKLEY, L.J., 1980: Changes in the ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid, and protein content during ontogenesis in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, and the effect of starvation. Fish Bull. U.S. 77, 703-708.
- BUCKLEY, L.J., 1981: Biochemical changes during ontogenesis of cod (*Gadus morhua* L.) and winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) larvae. Rapp. Proc.-v. Réunion. Cons. Int. Explor. Mer 178, 547-552.
- BUCKLEY, L. J. 1984: RNA/DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. Mar. Biol. 80, 291- 298.
- BUCKLEY, L.J., 1985: Changes in chemical composition with growth of young cod (*Gadus morhua*) and the effect of age or size on the RNA-DNA ratio, temperature and growth rate relation. International symposium on age and growth of fish, Des Moines, Iowa.
- BUCKLEY, L.J., TURNER, S.I., HALAVIK, T.A., SMIGIELSKY, A.S., DREW, S.M. & LAURENCE, G.C., 1984: Effects of temperature and food availability on growth, survival, and RNA-DNA ratio of larval sand lance (*Ammodytes americanus*). Mar. Ecol. Prog. Ser. 15, 91-97.
- BUCKLEY, L.J. & BULOW, F.J., 1987: Techniques for the estimation of RNA, DNA and protein in fish. In: The age and growth of fish (eds. R.C. Summerfelt and G.E. Hall). Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp 345-354.

- BUCKLEY, L.J., LOUGH, R.G., 1987: Recent growth, chemical composition and prey field of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and cod (*Gadus morhua*) larvae and post larvae on Georges Bank, May 1983. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 44, 14-25.
- BULOW, F.J., 1970: RNA-DNA ratios as indicators of recent growth rates of a fish. J. Fish. Res. Bd. Can. 27, 2343-2349.
- CESARONE, C.F., BOLOGNESI, C. & SANTI, L., 1979: Improved micro-fluorometric DNA determination in biological material using 33258 Hoechst. Anal. Biochem. 100, 188-197.
- CHAN, V.T.-W., FLEMING, K.A. & MCGEE, J.O'D., 1988: Simultaneous extraction from clinical biopsies of high-molecular-weight DNA and RNA: Comparative characterisation by biotinylated and 32p-labelled probes on Southern and Northern blots. Anal. Biochem. 168, 16-24.
- CHECKLEY, D.M., 1982: Selective feeding by Atlantic herring (*Clupea harengus*) larvae on zooplankton in natural assemblages. Mar. Ecol. Prog. Ser. 9, 245-253.
- CLARKE, A., RODHOUSE, P.G., HOLMES, L.H. & PASCOE, P.L., 1989: Growth rate and nucleic acid ratio in cultured cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 133, 229-240.
- CLEMMESSEN, C., 1985: Das Verhältnis von Ribonukleinsäure (RNA) zu Desoxyribonukleinsäure (DNA) bei hungernden und gefütterten Fischlarven. Dipl. Arbeit, Universität Kiel, 76 Seiten.
- CLEMMESSEN, C., 1987: Laboratory studies on RNA/DNA ratios of starved and fed herring (*Clupea harengus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. J. Cons. Int. Explor. Mer 43, 122-128.
- CLEMMESSEN, C., 1988: A RNA and DNA fluorescence technique to evaluate the nutritional condition of individual marine fish larvae. Meeresforschung 32, 134-143.
- CLEMMESSEN, C., 1989: RNA/DNA ratios of laboratory-reared and wild herring larvae determined with a highly sensitive fluorescence method. J. Fish. Biol. 35 (Supplement A), 331-333.
- CLEMMESSEN, C., 1990: Improvements in the fluorimetric determination of the RNA- and DNA- content in individual marine fish larvae. ICES C.M. 1990/ L:98 Biol. Ocean. Cmmtee, 14pp.
- CLIFFORD, A.J., RIUMALLO, J.A., BALIGA, B.S., MUNRO, H.N. & BROWN, P.R., 1972: Liver nucleotide metabolism in relation to amino acid supply. Biochim. Biophys. Acta 277, 443-458.
- COHEN, R.E. & LOUGH, R.G. 1983: Prey field of larval herring *Clupea harengus* on a continental shelf spawning area. Mar. Ecol. Prog. Ser. 10, 211-222.

- CONWAY, D.V.P., TRANTER, P.R.G. , FERNANDEZ DE PUELLES, M.L. & COOMBS, S.H., 1991: Feeding of larval sprat (*Sprattus sprattus*) and sardine (*Sardine pilchardus* Walbaum). ICES, C.M. 1991/L:76, pp 7.
- COOMBS, S.H., PIPE, R.K. & MITCHELL, C.E., 1981: The vertical distribution of eggs and larvae of blue whiting (*Micromesistius poutassou*) and mackerel (*Scomber scombrus*) in the Eastern North Atlantic and North Sea. Rapp. P.-v. Reun. Cons. int. Explor. Mer 178: 188-195.
- COOMBS, S.H. & HAKANSON, J.L., 1991: Diel variation in lipid and environmental composition of sprat (*Sprattus sprattus*) larvae at mixed and stratified sites in the German Bight of the North Sea. ICES, C.M. 1991/L:49, 11 pages.
- CUSHING, D. H., 1975: Marine ecology and fisheries. Cambridge University Press, Cambridge, 278pp.
- CUSHING, D. H., 1983: Are fish larvae too dilute to affect the density of their food organisms? J. Plankton Res. 5, 847-854.
- DABROWSKI, K., 1984: The feeding of fish larvae: present "state of the art" and perspectives. Reprod. Nutr. Dev. 24, 807-833.
- DAGG, M.J. & LITTLEPAGE, J.L., 1972: Relationships between growth rate and RNA, DNA, protein and dry weight in *Artemia salina* and *Euchaeta elongata*. Mar. Biol. 17, 162-170.
- DAVIS, R.W., BOTSTEIN, D. & ROTH, J.R., 1980: Advanced bacterial genetics. Cold Spring Harbour, New York.
- DeBEVOISE, A.E. & TAGHON, G.L., 1988: RNA:DNA ratios of the hydrothermal-vent vestimentiferans *Ridgeia piscesae* and *R. phaophiale* indicate variations in growth rates over small spatial scales. Mar. Biol 97, 421-426.
- DeFLAUN, M.F., PAUL, J.H. & DAVIS, D., 1986: Simplified method for dissolved DNA determinations in aquatic environments. Appl. Environ. Microbiol. 52 (4), 654-659.
- DEPLANO, M., CONNES, R., DIAZ, J.P. & BARNABE, G., 1991: Variation in the absorption of macromolecular proteins in larvae of the sea bass *Dicentrarchus labrax* during transition to the exotrophic phase. Mar. Biol. 110, 29-36.
- DORTCH, Q., ROBERTS, T.L., CLAYTON, J.R.Jr. & AHMED, S.I., 1983: RNA/DNA ratios and DNA concentrations as indicators of growth rate in planktonic marine organisms. Mar. Ecol. Prog. Ser. 13, 61-71.
- ECONOMOU, A.N., 1987: Ecology of survival in some gadoid larvae of the northern North Sea. Env. Biol. Fish. 19, 241-260.

- EHRLICH, K.F., 1974 a: Chemical changes during growth and starvation of herring larvae. In: The early life history of fish. J.H.S. Blaxter (ed.). Springer Verlag, Berlin, 301-323.
- EHRLICH, K.F., 1974 b: Chemical changes during growth and starvation of larval *Pleuronectes platessa*. Mar. Biol., 24, 39-48.
- EHRLICH, K.F., BLAXTER, J.H.S. & R. PEMBERTON, 1976: Morphological and histological changes during the growth and starvation of herring and plaice larvae. Mar. Biol., 35, 105-118.
- FERGUSON, M.M. & DRAHUSHCHAK, L.R., 1989: Effects of tissue collection and storage methods on nucleic acid determinations in white muscle of fishes. Trans. Am. Fish. Soc. 118, 709-713.
- FOLKVORD, A. & HUNTER, J., 1986: Size-specific vulnerability of northern anchovy, *Engraulis mordax*, larvae to predation by fishes. Fish. Bull. U.S. 84, 859-869.
- FORTIER, L. & LEGGETT, W.C., 1983: Vertical migration and transport of larval fish in a partially mixed estuary. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 40: 1543-1555.
- FRANK, K.T. & LEGGETT, W.C., 1982: Coastal water mass replacement; its effect on zooplankton dynamics and the predator-prey complex associated with the larval capelin (*Mallotus villosus*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 39, 991-1003.
- FRANK, K.T. & LEGGETT, W.C., 1986: Effect of prey abundance and size on the growth and survival of larval fish: an experimental study employing large volume enclosures. Mar. Ecol. Prog. Ser., 34, 11-22.
- FRANK, K.T. & McRUER, J., 1989: Nutritional status of field-collected haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) larvae from south western Nova Scotia: an assessment based on morphometrics and vertical distribution data. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 46, 125-133.
- FRASER, A.J., 1989: Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve and crustacean larvae. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 46: 1868-1873.
- FUKUDA, M., NAKANO, H. & YAMAMOTO, K., 1986: Biochemical changes in Pacific herring during early developmental stages. Hokkaido Daigaku Fac.. Fish Bull. 37, 30-37.
- GADOMSKI, D.M. & PETERSEN, J.H., 1988: Effects of food deprivation on the larvae of two flatfishes. Mar. Ecol. Prog. Ser. 44, 103-111.
- GOOLISH, E.M., BARRON, M.G. & ADELMAN, I.R., 1984: Thermoacclimatory response of nucleic acid and protein content of carp muscle tissue: influence of growth rate and relationship to glycine uptake by scales. Can. J. Zool. 62, 2164-2170.

- GOVONI, J.J., 1980: Morphological, histological and functional aspects of alimentary canal and associated organ development in larval *Leiostomus xanthurus*. Rev. Can. Biol. 39, 69-80.
- GOVONI, J.J., BOEHLERT, G.W. & WATANABE, Y., 1986: The physiology of digestion in fish larvae. Env. Biol. Fish 16, 59-77.
- GUILTBAULT, G.G., 1973: Practical fluorescence. Marcel Dekker, New York.
- HAKANSON, J.L., 1989 a: Condition of larval anchovy (*Engraulis mordax*) in the Southern California Bight, as measured through lipid analysis. Mar. Biol. 102: 153-159.
- HAKANSON, J.L., 1989 b: Analysis of lipid components for determining the condition of anchovy larvae, *Engraulis mordax*. Mar. Biol. 102, 143-151.
- HANSEN, P.E., LIED, E. & BORRESEN, T., 1989: Estimation of protein synthesis in fish larvae using an in vitro polyribosome assay. Aquaculture 79, 85-89.
- HEMPEL, G. & BLAXTER, J.H.S., 1967: Egg weight in Atlantic herring (*Clupea harengus* L.). J. Cons. Int. Explor. Mer 31, 170-195.
- HENSHAW, E.C., HIRSCH, C.A., MORTON, B.E. & HIATT, B.M., 1971: Control of protein synthesis in mammalian tissues through changes in ribosome activity. J. Biol. Chem. 246: 436-446.
- HEWITT, R.P., THEILACKER, G.H. & LO, N.C.H., 1985: Causes of mortality in young jack mackerel. Mar. Ecol. Prog. Ser. 26, 1-10.
- HINEGARDNER, R., 1968: Evolution of cellular DNA content in teleost fishes. The American Naturalist 102, 517-523.
- HJELMELAND, K., HUSE, I., JORGENSEN, T., MOLVIK, G. & RAAE, J., 1984: Trypsin and trypsinogen as indices of growth and survival potential of cod (*Gadus morhua* L.) larvae. In: Dahl, E.; Danielssen, D.S.; Moksness, E. and Solemdal, P., (eds.). The propagation of cod, *Gadus morhua*, Part 1. Institute of Marine Research, Flodevigen Biological Station, 189-211.
- HJORT, J., 1914: Fluctuations in the great fisheries of Northern Europe viewed in the light of biological research. Rapp. P.-v. Réun. Cons. Perm. int. Explor. Mer. 160, 1-228.
- HJORT, J., 1926: Fluctuations in the year classes of important food fishes. J. Cons. Perm. int. Explor. Mer, 1, 5-38.
- HOLM-HANSEN, O., SUTCLIFFE, W.H. Jr. & SHARP, J., 1968: Measurement of desoxyribonucleic acid in the ocean and its ecological significance. Limnol. Oceanogr. 13, 507-514.
- HOUDE, E.D., 1987: Fish early life dynamics and recruitment variability. Am. Fish. Soc. Symp. 2, 17-29.

- HOUDE, E.D., 1989: Comparative growth, mortality and energetics of marine fish larvae: temperature and implied latitudinal effects. *Fish. Bull. U.S.* 87 (3), 471-495.
- HOULIHAN, D.F., HALL, S.J., GRAY, C. & NOBLE, B.S., 1988: Growth rates and protein turnover in the Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45, 951-964.
- HOULIHAN, D.F., HALL, S.J. & GRAY, C., 1989: Effects of ration on protein turnover in cod. *Aquaculture* 79, 103-110.
- HOVENKAMP, F., 1990: Growth differences in larval plaice *Pleuronectes platessa* in the Southern Bight of the North Sea as indicated by otolith increments and RNA/DNA ratios. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 58, 205-215.
- HUNTER, J.R., 1976: Report of a colloquium on larval fish mortality studies and their relation to fisheries research, Jan. 1975. NOAA Tech. Rep. NMFS Circ., 395, 5pp.
- ILES, T.D. & SINCLAIR, M., 1982: Atlantic herring: stock discreteness and abundance. *Science* 215, 627-633.
- KAPUSCINSKI, J. & SKOCZYLAS, B., 1977: Simple and rapid fluorimetric method for DNA microassay. *Anal. Biochem.* 83, 252-257.
- KARSTEN, U. & WOLLENBERGER, A., 1972: Determination of DNA and RNA in homogenized cells and tissues by surface fluorometry. *Anal. Biochem.* 46, 135-148.
- KARSTEN, U. & WOLLENBERGER, A., 1977: Improvements in the ethidium bromide method for direct fluorometric estimation of DNA and RNA in cell and tissue homogenates. *Anal. Biochem.* 77, 464-470.
- KNUDSEN, G.M. & TILSETH, S., 1985: Growth, development and feeding success of Atlantic cod larvae, *Gadus morhua*, related to egg size. *Trans. Am. Fish. Soc.* 114: 507-511.
- KUHLMANN, D., QUANTZ, G. & WITT, U., 1981: Rearing of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.) on cultured food organisms and postmetamorphosis growth on natural and artificial food. *Aquaculture* 23, 183-196.
- KVENSETH, P.G. & OIESTAD, V., 1984: Large scale rearing of cod fry on the natural production in an enclosed pond. In: The propagation of cod, *Gadus morhua* L.. Flodevigen Rapports 1, 645-655.
- LABARCA, C. & PAIGEN, K., 1980: A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* 102, 344-352.
- LASKER, R., 1975: Field criteria for the survival of anchovy larvae: The relation between inshore chlorophyll maximum layers and successful first feeding. *U.S. Fish. Wildl. Serv. Fish. Bull.*, 73, 455-462.

- LASKER, R., FEDER, H.M., THEILACKER, G.H. & MAY, R.C., 1970: Feeding, growth and survival of *Engraulis mordax* larvae reared in the laboratory. Mar. Biol. 5, 345-353.
- LAUFF M. & HOFER, R., 1984: Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. Aquaculture 37, 335-346.
- LENZ, J., 1970: "Zooplankton": In: G. Rheinheimer (Hrsg.): Chemische, mikrobiologische und planktologische Untersuchungen in der Schlei im Hinblick auf deren Abwasserbelastung. Kieler Meeresforschung 26, 203-213.
- LePECQ, J.-B. & PAOLETTI, C., 1966: A new fluorometric method for RNA and DNA determination. Anal. Biochem. 17, 100-107.
- LIED, E., LUND, B. & VON DER DECKEN, A., 1982: Protein synthesis in vitro by epaxial muscle polyribosomes from cod, *Gadus morhua*. Comp. Biochem. Physiol. 72B, 187-193.
- LIED, E. & ROSEN LUND, G., 1984: The influence of the ratio of protein energy to total energy in the feed on the activity of protein synthesis in vitro, the level of ribosomal RNA and the RNA-DNA ratio in the white trunk muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comp. Biochem. Physiol. 77A, 489-494.
- LIZARDI, P.M. & ENGELBERG, A., 1979: Rapid isolation of RNA using proteinase K and sodium perchlorate. Anal. Biochem. 98, 116-122.
- LOUGHNA, P.T. & GOLDS PINK, G., 1984: The effects of starvation upon protein turnover in red and white myotomal muscle of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Biol. 25, 223-230.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. & SAMBROOK, J., 1982: Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory publications, New York, 521pp.
- MARGULIES, D., 1989: Effects of food concentration and temperature on development, growth and survival of white perch, *Morone americana*, eggs and larvae. Fish. Bull. U.S. 87 (1), 63-72.
- MARTIN, F.D., WRIGHT, D.A. & MEANS, J.C., 1984: Fatty acids and starvation in larval striped bass (*Morone saxatilis*). Comp. Biochem. 77, 785-790.
- MARTIN, F.D., WRIGHT, D.A., MEANS, J.C. & SETZLER-HAMILTON, E.F., 1985: Importance of food supply to nutritional state of larval striped bass in the Potomac river estuary. Trans. Amer. Fish. Soc. 114, 137-145.
- MAY, R.C., 1974: Larval mortality in marine fishes and the critical period concept. In: "The early life history of fish" (J.H.S. Blaxter ed.), pp. 3-19. Springer Verlag, Berlin and New York.

- McGURK, M.D., 1984: Effects of delayed feeding and temperature on the age of irreversible starvation and on the growth rates and mortality of Pacific herring larvae. *Mar. Biol.* 84, 13-26.
- McMILLAN, D.N. & HOULIHAN, D.F. 1988: The effect of refeeding on tissue protein synthesis in rainbow trout. *Physiol. Zool.* 61, 429-441.
- MIGLAVS, I. & JOBLING, M., 1989: Effects of feeding regime on food consumption, growth rates and tissue nucleic acids in juvenile Arctic char, *Salvelinus alpinus*, with particular respect to compensatory growth. *J. Fish. Biol.* 34, 947-957.
- MILLER, T.J., CROWDER, L.B., RICE, J.A. & MARSHALL, E.A., 1988: Larval size and recruitment mechanisms in fishes: towards a conceptual framework. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 45: 1657-1670.
- MILLWARD, D.J., GARLICK, P.J., JAMES, W.P.T, NNANYELUGO, D.O. & RYATT, J.S., 1973: Relationship between protein synthesis and RNA content in skeletal muscle. *Nature* 241, 204-205.
- MILLWARD, D.J., GARLICK, P.J., NNANYELUGO, D.O. & WATERLOW, J.C. 1976: The relative importance of protein synthesis and breakdown in the regulation of muscle mass. *Biochem. J.* 156: 185-188.
- MUNK, P. & KIORBOE, T., 1985: Feeding behaviour and swimming ability of larval herring (*Clupea harengus*) in relation to density of copepod nauplii. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 24, 15-21.
- MUNRO, H.N. & FLECK, A., 1966 a: The detection of nucleic acids. In: D. Glick (ed.) *Methods of biochemical analysis*. Interscience Publishers, New York, NY. 17, 113-176.
- MUNRO, H.N. & FLECK, A., 1966 b: Recent developments in the measurement of nucleic acids in biological materials. *Analyst* 91, 78-87.
- NELLEN, W., 1965: Neue Untersuchungen über den "Schleihering", eine lokale Brackwasserform von *Clupea harengus* L.. *Ber. dtsch. wiss. Komm. Meeresforsch.* 18: 163-193.
- NELLEN, W., 1986: A hypothesis on the fecundity of bony fish. *Meeresforsch.* 31, 75-89.
- NEVE, H., 1985: Vergleichende Charakterisierung von Plasmiden mesophiler Milchsäurestreptokokken durch Konjugation, Transduktion, Restriktionsanalysen und DNA-DNA Hybridisierungen. Dissertation, Universität Kiel.
- O'CONNELL, C.P., 1976: Histological criteria for diagnosing the starving condition in early post yolk-sac larvae of the northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Girard J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 25, 285-312.



- O'CONNELL, C.P., 1980: Percentage of starving northern anchovy, *Engraulis mordax*, larvae in the sea as estimated by histological methods. Fish. Bull. U.S. 78, 475-489.
- O'CONNELL, C.P., 1981: Development of organ systems in the northern anchovy *Engraulis mordax* and other teleosts. Am. Zool. 21, 429-446.
- OIESTAD, V., KVENSETH, P.G. & FOLKVORD, A., 1985: Mass production of Atlantic cod juveniles *Gadus morhua* in a Norwegian salt water pond. Trans. Am. Fish. Soc. 114, 590-595.
- OSIETZKI, H. , 1991: Umwelteinflüsse auf den Energiestoffwechsel der Eier und Larven von Knochenfischen und Konsequenzen für den weiteren Wachstumsverlauf. Dipl. Arbeit, Universität Hamburg, 77S..
- PEDERSEN, B. H., NILSSEN, E.M. & HJELMELAND, K., 1987: Variations in the content of trypsin and trypsinogen in larval herring (*Clupea harengus*) digesting copepod nauplii. Mar. Biol. 94, 171-181.
- PEDERSEN, B.H., UGELSTAD, I. & HJELMELAND, K., 1990: Effects of a transitory low food supply in the early life of larval herring (*Clupea harengus*) on mortality, growth and digestive capacity. Mar. Biol. 107, 61-66.
- PRASAD, A.S., DuMOUCHELLE, E., KONIUCH, D. & OBERLEAS, D., 1972: A simple fluorometric method for the determination of RNA and DNA in tissues. J. Lab. Clin. Med. 80, 598-602.
- RAAE, A.J., OPSTAD, I., KVENSETH, P. & WALTHER, B.T., 1988: RNA, DNA and protein during early development in feeding and starved cod (*Gadus morhua* L.) larvae. Aquaculture 73, 247-259.
- REGNAULT, M. & LUQUET, P., 1974: Study by evolution of nucleic acid content of prepuberal growth in the shrimp, *Crangon vulgaris* . Mar. Biol. 25, 291-298.
- RICE, J.A., CROWDER, L.B. & BINKOWSKI, F.P., 1987: Evaluating potential sources of mortality for larval bloater (*Coregonus hoyi*): starvation and vulnerability to predation. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 44, 467-472.
- ROBINSON, S.M.C. & WARE, D.M., 1988: Ontogenetic development of growth rates of larval Pacific herring, *Clupea harengus pallasii*, measured with RNA-DNA ratios in the Strait of Georgia, British Columbia. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45, 1422-1429.
- ROSENTHAL, H., 1969: Verdauungsgeschwindigkeit, Nahrungswahl und Nahrungsbedarf bei den Larven des Herings, *Clupea harengus* L.. Ber. dt. wiss. Komm. Meeresforsch. 20, 60-69.

- ROSENTHAL, H. & ALDERDICE, D.F., 1976: Sublethal effects of environmental stressors, natural and pollutional, on marine fish eggs and larvae. J. Fish. Res. Bd. Can. 33, 2047-2065.
- ROTHSCHILD, B.J., 1982: Report of fisheries ecology meeting. Woods Hole Oceanogr. Inst. Tech. Rep. WHO I-82-28, Woods Hole, MA, USA, 30pp.
- ROTHSCHILD, B.J., 1986: Dynamics of marine fish populations. Harvard University Press, Cambridge.
- RUSSELL, W.C., NEWMAN, C. & WILLIAMSON, D.H., 1975: A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. Nature 253, 461-462.
- SACHS, L., 1983: Angewandte Statistik. 6. Auflage, Springer Verlag Berlin.
- SCHADT, J., 1986: Eine vergleichende Betrachtung der Planktonsituation auf den Laichplätzen des Downs- und Buchan- Herings während der Fortpflanzungszeit beider Bestände. Dipl. Arbeit, Universität Kiel, 146 S..
- SCHMIDT, G. & THANNHAUSER, S.J., 1945: A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues. J. Biol. Chem. 161, 83-89.
- SCHNACK, D., 1972: Nahrungsökologische Untersuchungen an Heringslarven. Ber. dt. wiss. Komm. Meeresforsch. 22, 273-343.
- SCHNACK, D., 1981: Studies on the mortality of Pacific herring larvae during their early development, using artificial in situ containments. Rapp. P.-v. Reun. Cons. int. Explor. Mer. 178, 135-142.
- SETZLER-HAMILTON, E.M., WRIGHT, D.A., MARTIN, F.D., MILLSAPS, C.V. & WHITLOW, S.I., 1987: Analysis of nutritional condition and its use in predicting striped bass recruitment: Field studies. American Fisheries Society Symposium 2, 115-128.
- SHELBOURNE, J.E., 1957: The feeding and condition of plaice larvae in good and bad plankton patches. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 36, 539-552.
- SIEG, A., 1989: Vergleichende histologische Untersuchungen an Fischlarven. Diplomarbeit, Universität Hamburg, 149 S.
- SIEG, A. CLEMMESSEN, C. & UEBERSCHÄR, B., 1989: Comparison of biochemical and histological methods for the evaluation of the in situ nutritional condition of fish larvae. ICES C.M. 1989/ L:4, 11pp.
- SINCLAIR, M., TREMBLAY, M.J. & BERNAL, P., 1985: El Nino events and variability in a Pacific Mackerel (*Scomber japonicus*) survival index: support for Hjort's second hypothesis. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 42, 602-608.
- SISSSENWINE, M.P., 1984: Why do fish populations vary? In: Exploitation of marine communities (ed. R.M. MAY) Dahlem Konferenzen, Springer Verlag, 59-94 pp.

- THEILACKER, G.H. & McMASTERS, M.F. 1971: Mass culture of the rotifer, *Brachionus plicatilis*, and its evaluation as a food for larval anchovies. Mar. Biol. 10, 183-188.
- THEILACKER, G.H. & DORSEY, K., 1980: Larval fish diversity, a summary of laboratory and field research. In: Workshop on the effect of environmental variation on the survival of larval pelagic fishes. UNESCO, Intergovern. Oceanogr. Comm., Workshop Rep., 28, S. 105 - 142.
- THEILACKER, G.H., 1978: Effect of starvation on the histological and morphological characteristics of jack mackerel, *Trachurus symmetricus* larvae. Fish. Bull. U.S. 76, 403-414.
- THEILACKER, G.H., 1980: Rearing container size effects morphology and nutritional condition of larval jack mackerel, *Trachurus symmetricus*. Fish. Bull. U.S. 78, 789-791.
- THEILACKER, G.H., 1986: Starvation induced mortality of young sea- caught jack mackerel, *Trachurus symmetricus*, determined with histological and morphological methods. Fish. Bull., U.S. 84, 1-17.
- THOMPSON, A.B. & HARROP, R.T., 1991: Feeding dynamics of fish larvae on copepoda in the western Irish Sea, with particular reference to cod, *Gadus morhua*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 68, 213-223.
- UEBERSCHÄR, B., 1985: Untersuchungen über die Verdauungsenzyme von Fischlarven. Dipl. Arbeit Universität Kiel, 111 pp.
- UEBERSCHÄR, B., 1987: A highly sensitive method for the determination of proteolytic enzyme activities in individual marine fish larvae. Int. Coun. Explor. Mer, Count. Meet. L: 24, 11p.
- UEBERSCHÄR, B., 1988: Determination of the nutritional condition of individual marine fish larvae by analysing their proteolytic enzyme activities with a highly sensitive fluorescence technique. Meeresforsch. 32, 144-154.
- VON DER DECKEN, A., 1989: Ration size in the feeding of cod (*Gadus morhua*): Effect on skeletal muscle proteins, with special reference to myosin heavy chain. Aquaculture 79, 47-52.
- WALDMANN, J., 1961: Untersuchungen an Heringslarven und Zooplankton des Greifswalder Bodden in den Jahren 1958 und 1959. Zeitschrift für Fischerei, Band 10, Heft 6, 523-537.
- WANG, S.Y. & STICKLE, W.B., 1986: Changes in nucleic acid concentration with starvation in the blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun. J. Crust. Biol. 6, 49-56.
- WARE, D., DeMANDIOLA, B. & NEWHOUSE, D., 1981: Behaviour of first feeding Peruvian anchovetta, *Engraulis ringens*. In: Rapp. P. v.-Réun. Cons. Int. Explor. Mer, 78: 467 - 474.

- WATANABE, Y. 1985: Histological changes in the liver and intestine of freshwater goby larvae during short-term starvation. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish 51 (5), 707-709.
- WERNER, R.G. & BLAXTER, J.H.S., 1980: Growth and survival of herring larvae (*Clupea harengus*) in relation to prey density. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37, 1063-1069.
- WERNER, R.G. & BLAXTER, J.H.S., 1981: The effect of prey density on mortality, growth and food consumption in larval herring (*Clupea harengus* L.). Rapp. P.-v. Réun. Cons. int. Explor. Mer 176, 405-408.
- WESTERMAN, M.E. & HOLT, G.J., 1988: The RNA-DNA ratio: Measurement of nucleic acids in larval *Sciaenops ocellatus*. Contributions in Marine Science 30 (Supplement), 117-124.
- WIEBE, P.H., BURT, K.H., BOYD, S.H. & MORTON, A.W., 1976: A multiple opening/closing net and environment sensing system for sampling zooplankton. J. Mar. Res. 34: 313-326.
- WITT, U., KOSKE, H.P., KUHLMANN, D., LENZ, J. & NELLEN, W., 1981: Production of *Nannochloris spec.* (Chlorophyceae) in large scale outdoor tanks and its use as food organisms in marine aquaculture. Aquaculture 23, 171-181.
- WRIGHT, D.A. & HETZEL, E.W., 1985: Use of RNA/DNA ratios as an indicator of nutritional stress in the American oyster *Crassostrea virginica*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 25, 199-206.
- WRIGHT, D.A. & MARTIN, F.D. 1985: The effect of starvation on RNA/DNA ratios and growth of larval striped bass, *Morone saxatilis*. J. Fish. Biol. 27, 479-485.
- WOBUS, U., 1980: Isolierung, Fraktionierung und Hybridisierung von Nukleinsäuren. Verlag Chemie, Weinheim.
- YOUNG, V.R., 1970: The role of skeletal muscle and cardiac muscle in the regulation of protein metabolism. In: H.N. Munro (ed.), Mammalian Protein metabolism, Vol. IV. Academic Press, New York, NY, pp 585-674.

## **Verzeichnis der Abkürzungen**

<b>DNA</b>	<b>= Desoxyribonukleinsäure</b>
<b>EB</b>	<b>= Ethidiumbromid</b>
<b>HLN</b>	<b>= Helgoländer Larvennetz</b>
<b>ICES</b>	<b>= Internationaler Rat für Meeresforschung</b>
<b>M</b>	<b>= Mol</b>
<b>MOCNESS</b>	<b>= Multiple Opening and Closing Net Environmental Sensing System</b>
<b>m-RNA</b>	<b>= Messenger-RNA</b>
<b>PNR</b>	<b>= point of no return</b>
<b>r-RNA</b>	<b>= ribosomale RNA</b>
<b>RNA</b>	<b>= Ribonukleinsäure</b>
<b>S</b>	<b>= Svedberg (Sedimentationskoeffizient)</b>
<b>SDS</b>	<b>= Natriumdodecylsulfat</b>
<b>SL</b>	<b>= Standardlänge</b>
<b>t-RNA</b>	<b>= Transfer-RNA</b>
<b>v/v</b>	<b>= Verdünnung: Volumen pro Volumen</b>
<b>w/v</b>	<b>= Verdünnung: Gewicht pro Volumen</b>

**Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.**

**Ferner versichere ich, daß ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen.**

**Kiel, den**

.....

## **Lebenslauf**

**Name:** Catriona Mary Clemmesen-Bockelmann,  
geborene Clemmesen

**Geburtsdatum und -ort:** 22.10.58 in Glasgow/ Schottland

**Staatsangehörigkeit:** Deutsch

**Familienstand:** verheiratet seit 23.10.87 mit Dr. Wilhelm Bockelmann,  
2 Kinder, Ayla (14.04.88) und Daniel (06.04.91)

## **Beruflicher Werdegang:**

**Dez. 1977:** allgemeine Hochschulreife am Copernicus Gymnasium in Norderstedt

**1978-1985:** Studium der Diplom-Biologie an der Christian-Albrechts-Universität Kiel

1980 Vordiplomsprüfung, Examensnote "sehr gut"

1984 Diplomprüfung im Hauptfach Fischereibiologie, Nebenfächer Biochemie und Zoologie

1984-1985: Diplomarbeit an der Universität Kiel bei Prof. Nellen, Thema: "Das Verhältnis von Ribonukleinsäure (RNA) zu Desoxyribonukleinsäure (DNA) bei hungernden und gefütterten Fischlarven, Examensnote "sehr gut"

**Sep. 1982 - Jun. 1983:** Studium an der University of Washington, School of Fisheries, Seattle, Washington, U.S.A. als Fulbright-Stipendiat

1983: Abschluß an der University of Washington: "Bachelor of Science in Fisheries"

**Jan. - Aug. 1986:** Promotionsstipendium der Universität Kiel

**Sep. 1986 - Nov. 1987:** wissenschaftliche Mitarbeiterin im DFG- Projekt Ne99/19-1 Prof. Nellen (Biochemie von Fischlarven) als Gastwissenschaftler am Institut für Meereskunde an der Universität Kiel

**Apr. 1988 - Okt. 1988:** Erziehungsurlaub

**Nov. 1988 - Dez. 1990:** wissenschaftliche Mitarbeiterin im BMFT- Projekt MFE 0541-9 bei Prof. Nellen (Untersuchung zur Lebenssituation mariner Fischlarven durch die Bestimmung ihres Ernährungszustandes mit Hilfe der Analyse proteolytischer Enzymaktivitäten und RNA/DNA Verhältnisse) als Gastwissenschaftler am Institut für Meereskunde an der Universität Kiel

**Apr. 1991 - Mär. 1992:** Erziehungsurlaub

Kiel, den 31.01.92

## **Berichte aus dem Zentrum für Meeres- und Klimaforschung**

An der Berichtsreihe sind folgende Institute der Universität Hamburg beteiligt:

**Meteorologisches Institut (MI)**  
Bundesstr. 55, 2000 Hamburg 13

**Institut für Meereskunde (IfM)**  
Tropelwitzstr. 7, 2000 Hamburg 54

**Institut für Hydrobiologie und Fischereiwissenschaft (IHF)**  
Zeiseweg 9, 2000 Hamburg 50

**Institut für Geophysik (IfG)**  
Bundesstr. 55, 2000 Hamburg 13

**Institut für Biogeochemie und Meereschemie (IfBM)**  
Bundesstr. 55, 2000 Hamburg 13

### Verzeichnis der erschienenen Hefte:

1. Nellen, W., D. Schnack und B. Zeitschel (1988): Expeditionsbericht über die METEOR-Reise 5, Abschnitt 3. (IHF)
2. Moll, A. (1989): Simulation der Phytoplanktodynamik für die zentrale Nordsee im Jahresverlauf. (IfM)
3. Thiel, H. und G. Schriever (1989): Cruise Report DISCOL 1 / Sonne-Cruise 61. (IHF)
4. Legutke, S. (1989): Modelluntersuchungen zur Variabilität im Strömungssystem des europäischen Nordmeers. (IfM)
5. Sündermann, A. (1990): Die Anwendung von adaptiven Gittern in zwei einfachen Modellen für eine atmosphärische Rollenzirkulation. (MI)
6. Schriever, G. (1990): Cruise Report DISCOL 2 / Sonne-Cruise 64. (IHF)
7. Salge, U. (1990): Strukturelle und sedimentäre Entwicklung des Süd- Tasman- Plateaus: Eine seismostratigraphische Interpretation reflexionsseismischer Daten. (IfBM)
8. Peters, G. (1990): Untersuchungen über die Ursachen der Krankheitsanfälligkeit von unter Umweltstreß lebenden Fischen, durchgeführt am Beispiel der Arten Aal, Forelle sowie Steinbutt. (IHF)
9. Nellen, W. (1990): Working Report on Cruise No. 11, leg 3 of RV METEOR. (IHF)
10. Pfannkuche, O. et al. (1990): BIOTRANS - Biologischer Vertikaltransport und Energiehaushalt in der bodennahen Wasserschicht der Tiefsee. (IHF)
11. Tessmer, M.E. (1990): Seismische Modellierung unter Berücksichtigung der freien Oberfläche mithilfe einer spektralen Tschebyscheff-Methode. (IfG)
12. Bigalke, K. (1991): Interaktive Modellkopplung zur Berücksichtigung heißer Punktquellen in Gitterpunktsmodellen und Einfluß der Kopplungsstufe auf die Immission. (MI)



13. Romeiser, R. (1991): Validation of the WAM Wave Prediction Model by GEOSAT Wave Height Data. (IfM) (in Vorb.)
14. Mihardja, D.K. (1991): Energy and momentum budget of the tides in Indonesian waters. (IfM)
15. Rhodin, A. (1991): Kaltfronten unter dem Einfluß der Reibung in der Grenzschicht und ihre Modifikation bei unterschiedlicher Bodenrauigkeit und Bodentemperatur. Numerische Simulationen. (MI)
16. Dorau, F. (1991): Eindimensionale Inversion bandbegrenzter Seismogramme. (IfG)
17. Sausen, R. (1991): Über die Verwendung von Korrekturverfahren in Zirkulationsmodellen. (MI)
18. Hennemuth, B. et al. (1991): FRONTEX 1989 - Meßergebnisse zu neun Kaltfronten (MI)
19. Kausch, H. [Hrsg.] (1991): Die Unterelbe - Natürlicher Zustand und Veränderungen durch den Menschen. (IHF)
20. Miranda-Alonso, S. (1991): A boundary-value inverse model and its application to the calculation of tidal oscillation systems in the Western South Atlantic Ocean. (IfM)
21. Manschke, A. (1991): Fernerkundung der Basistemperatur konvektiver Wolken über dem Ozean. (MI)
22. Frauenheim, K. (1991): Entwicklung einer Probennahmestrategie zur quantitativen Erfassung des Benthos. (IHF)
23. Pohlmann, T. (1991): Untersuchung hydro- und thermodynamischer Prozesse in der Nordsee mit einem dreidimensionalen numerischen Modell. (IfM)
24. Karbe, L.; Mädler, K.; Janski, B. [Hrsg.] (1991): Biologische Effekte von Schadstoffen und toxisches Potential von Wasser und Sediment in Elbe und Nordsee. (IHF)
25. Freter, H. (1991): Mathematisch-numerische Untersuchungen zu einer Integralgleichungsmethode für die Modellierung und Inversion seismischer Wellenfelder. (IfG)
26. Thiel, H.; Foell, Eric J.; Schriever, G. (1992): Potential environmental effects of deep seabed mining. (IHF)

**Die Berichte aus dem Zentrum für Meeres- und Klimaforschung werden aufgeteilt in die Reihen**

**Reihe A: Meteorologie**  
**Reihe B: Ozeanographie**  
**Reihe C: Geophysik**  
**Reihe D: Biogeochemie und Meereschemie**  
**Reihe E: Hydrobiologie und Fischereiwissenschaft**  
**Reihe Z: Interdisziplinäre Zentrumsberichte**

<b>Berichte aus dem Zentrum für Meeres- und Klimaforschung - Reihe E</b>
--

**Institut für Hydrobiologie und Fischereiwissenschaft (Hydrobiologische Abteilung)  
Zeiseweg 9, 2000 Hamburg 50**

**oder:**

**Institut für Hydrobiologie und Fischereiwissenschaft (Fischereiwissenschaftliche Abteilung)  
Olbersweg 24, 2000 Hamburg 50**

- 1. Röpke, A. (1992): Eine vergleichende Studie zur Vertikalverteilung von Fischlarven in Relation zur physikalischen Stratifikation der Wassersäule im nördlichen Arabischen Meer.**
- 2. Schriever, G. und H. Thiel (1992): Cruise Report DISCOL 3 / Sonne Cruise 77.**
- 3. Clemmesen-Bockelmann, C. (1992): Das RNA/DNA Verhältnis als Indikator für den Ernährungszustand von Fischlarven.**